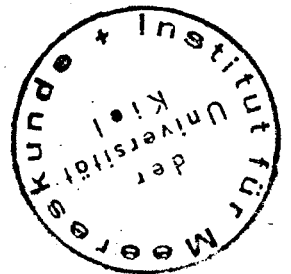


S ~~2194~~

D 120

VERGLEICHENDE ÖKOLOGISCH-PHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN
ZUR ZELLULÄREN THERMISCHEN RESISTENZ MARINER VERTEBRATEN
UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER GEFRIERRESISTENZ

Als Habilitationsschrift der
Hohen Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel



vorgelegt von
Hans Theede
- Kiel 1970 -

I n h a l t

- A. EINLEITUNG
- B. TIERMATERIAL
- C. METHODEN
- D. ERGEBNISSE

I. Artspezifische Unterschiede der zellulären thermischen Resistenz und ihre Beziehungen zum ökologischen Verhalten und zur geographischen Verbreitung der Arten

- 1) Gefrierresistenz
- 2) Abkühlungsresistenz
- 3) Hitzeresistenz

II. Einflüsse verschiedener Faktoren auf die zelluläre thermische Resistenz, insbesondere die Gefrierresistenz

- 1) Jahreszeit
- 2) Anpassungstemperatur innerhalb des ökologischen Temperaturbereiches
- 3) Kurzfristige Einwirkung extremer subletaler Temperatur
- 4) Salzgehalt des Außenmediums, Temperatur-Salzgehalts-Kombinationen
- 5) Ionenwirkungen
- 6) Luftexposition
- 7) Sauerstoffmangel
- 8) Gefrierschutzsubstanzen

III. Analyse der Gefrierresistenz mit Hilfe von Enzymtests

- 1) Vergleichende Untersuchungen bei unterschiedlich gefrierresistenten Arten
- 2) Auswirkungen unterschiedlicher Kälteexposition

- E. DISKUSSION
- F. ZUSAMMENFASSUNG
- G. ZITIERTER LITERATUR

A. EINLEITUNG

Bei marinen Tieren ist der Kältetod eine ebenso verbreitete Erscheinung wie der Hitzetod, besonders in Lebensräumen, in denen starke unregelmäßige Temperaturschwankungen auftreten (BRONGERSMA-SANDERS, 1957). Im Gegensatz aber zu zahlreichen Untersuchungen über die Hitzeresistenz und deren Veränderungen durch Adaptationen (Literaturangaben u.a. bei PRECHT, CHRISTOPHERSEN & HENSEL, 1955; GUNTER, 1957; PROSSER, 1958, 1967; PROSSER & BROWN, 1962; VERNBERG, 1962; KINNE, 1963, 1964a, b; DILL et al, 1964; PRECHT, 1964; PRECHT et al., 1966; SCHLIEPER, 1966; ROSE, 1967; TROSHIN, 1967) liegen wesentlich weniger Arbeiten über die Kälteresistenz und Kälteadaptationen bei marinen Wirbellosen vor. Das gilt in ganz besonderem Maße für die Resistenz von Geweben, Zellen und Zellbestandteilen. Das Schwergewicht der Untersuchungen dieser Arbeit soll deshalb auf der Kälteresistenz liegen.

Da sich die schädigenden Wirkungen der Kälte auf Organismen dadurch wesentlich voneinander unterscheiden, ob die auftretenden niedrigen Temperaturen ohne Eisbildung verlaufen oder mit einer solchen verbunden sind, wurde zwischen Abkühlungsresistenz und Gefrierresistenz unterschieden (vgl. LEVITT, 1958; THEEDE, 1967). Unter Abkühlungsresistenz soll hier die Fähigkeit verstanden werden, bei solchen Kältegraden zu überleben, bei denen das umgebende Meerwasser noch nicht ausfriert. Dagegen liegt Gefrierresistenz vor, wenn die Wirkungen von extra- oder intrazellulärer Eisbildung ertragen werden.

Das Vorkommen einer nennenswerten Gefrierresistenz scheint bei marinen Evertebraten auf Arten beschränkt zu sein, die in den borealen und kälteren Regionen im Supra- und Eulitoral überwintern können (KANWISHER, 1966). Im Winter ist diese Resistenz ein entscheidender Faktor für die obere Ausbreitungsgrenze der marinen Fauna in der Gezeitenregion, und zwar umso mehr, je weiter man nach Norden vordringt. In strengen Wintern kann Massensterben der Makrofauna beobachtet werden (BLEGVAD, 1929;

BRONGERSMA-SANDERS, 1957; CRISP, 1964a, 1964b. Dabei übt der Frost eine starke Selektionswirkung auf die marinen Tiere der Gezeitenregion aus. Je weiter man sich der Arktis nähert, umso mehr fällt eine zunehmende Verarmung der Gezeitenfauna auf. So finden in der subarktischen Region im südlichen Teil von Spitzbergen die letzten typischen Vertreter der Gezeitenfauna der temperierten Region, die Seepocke *Balanus balanoides* und die spitze Strandschnecke *Littorina saxatilis*, ihre nördliche Verbreitungsgrenze (GERLACH, 1965). Diese beiden Arten überwintern auch an der Südwestküste Grönlands, *Balanus balanoides* im Eis eingeschlossen und *Littorina saxatilis* vorwiegend in Felsenspalten zurückgezogen (PETERSEN, 1962a und b). In der eigentlichen arktischen Region auf Spitzbergen kommen marine Makrotiere, die allein auf die Gezeitenregion beschränkt sind, nicht mehr vor. Die wenigen Arten, die man noch stellenweise finden kann, bewohnen auch frostfreie sublitorale Zonen. Nur im Sommer dringen sie vorübergehend in die Gezeitenregion ein, im Winter dagegen ziehen sie sich in tiefere Wasser- und Bodenschichten zurück (GERLACH, 1965). Arten der marinen Mikrofauna, Protozoen, Rotatorien, Tardigraden und Nematoden sowie verschiedene Insektenarten dürften die häufigsten wirbellosen Tiere sein, die in der Arktis und Antarktis wiederholtes Einfrieren und Auftauen erfolgreich überleben können (SCHOLANDER et al., 1953; BUNT, 1967; TILBROOK, 1970).

Bisher existieren über die Gefrierresistenz mariner Evertebraten relativ wenig experimentelle Untersuchungen. KANWISHER (1955) fand, daß einige Muscheln und Schnecken aus der Gezeitenregion langfristiges Einfrieren ertragen können, während Arten, die nur im tieferen Wasser leben, dazu nicht in der Lage sind. Eine hohe winterliche Gefrierresistenz wiesen SÖMME (1966) und CRISP & RITZ (1967) bei *Balanus balanoides* nach, außerdem fand SÖMME (1966) eine solche bei den Strandschnecken *Littorina littorea* und *L. rudis*. Nach ZHYUBIKAS (1968) sind Miesmuscheln aus dem Eulitoral kälterestanter (bei -10°C) als solche aus tieferen Gezeitentümpeln.

SOUTHWARD (1958) bestimmte die Überlebenszeiten einiger Seepocken- und Schneckenarten von der südenglischen Küste bei hohen und niedrigen Temperaturen. In Tab. 1 sind Werte für die Überlebenszeiten dieser Tiere bei niedrigen Temperaturen wiedergegeben. Danach haben die sessilen Seepocken eine wesentlich größere Resistenz gegenüber Hitze und Kälte als die beweglichen Schneckenarten. Im einzelnen bestehen nach SOUTHWARD (1958) zwischen der Resistenz gegenüber beiden Temperaturextremen deutliche Beziehungen zur natürlichen Verbreitung der Arten. Die Art mit mehr nördlicher Verbreitung, *Balanus balanoides*, ist bei -5°C ungefähr doppelt so lange lebensfähig wie *Chthamalus stellatus*. *Elminius modestus*, eine aus Australien eingeschleppte Art, die an der Südküste von England und Wales jetzt häufig vorkommt, ist weniger resistent. Noch empfindlicher gegenüber Hitze und Kälte reagiert die Seepocke *Balanus perforatus*, die im Litoral auf die Zone unterhalb des *Balanus-balanoides*-Gürtels beschränkt ist.

Tabelle 1

Stunden Expositionsdauer in kalter Luft bis zum Eintritt von 50% Mortalität (nach SOUTHWARD, 1958; verkürzt).

Arten	-10°C	Temperatur -5°C	0°C
<i>Balanus balanoides</i>	12 - 24	120 - 190	∞
<i>Chthamalus stellatus</i>	12 - 24	72 - 120	∞
<i>Elminius modestus</i>	12 - 24	48 - 72	∞
<i>Balanus perforatus</i>	< 3	< 22	∞
<i>Monodonta lineata</i>	2 - 3	16 - 24	138 - 179
<i>Gibbula umbilicalis</i>	2 - 3	16	30 - 79
<i>Gibbula cineraria</i>	2 - 3	2 - 3	12 - 30
<i>Calliostoma zizyphinum</i>	2 - 3	2 - 3	12 - 24

Bei den Schnecken aus dem Eulitoral läßt die Temperaturresistenz deutlichere Beziehungen zur vertikalen Verbreitung als zur geographischen erkennen. So sind die Arten *Monodonta lineata* (aus dem oberen Eulitoral) und *Gibbula umbilicalis* (aus dem mittleren Eulitoral) - ihr Vorkommensbereich erstreckt sich weiter nach Süden - resistenter gegenüber hohen und niedrigen Temperaturen als *Gibbula*

cineraria (aus der mittleren bis unteren Gezeitenregion) und *Calliostoma zizyphinum* (aus der unteren Gezeitenregion) deren Verbreitungsgebiet mehr nach Norden reicht. Nach SOUTHWARD nimmt bei diesen Arten die Temperaturresistenz mit der Fähigkeit zu, Exposition an der Luft zu ertragen.

An der norwegischen Küste stellten NAIR und LEIVESTAD (1958) bei einigen marinen holzbohrenden Crustaceen eine beträchtliche Gefrierresistenz fest. Um sich aber vor zu extremer winterlicher Kälte zu schützen, weichen diese Tiere im Herbst und im Winter zu einem niedrigeren Niveau in dem Pfahl aus, den sie bewohnen. Folglich können nach den Wintermonaten leere Bohrgänge in den Holzpfehlen oberhalb der Wasserlinie beobachtet werden. Bohrrasseln, die in der kalten Jahreszeit zu hoch in ihrem Pfahl verbleiben, werden durch die Kälte getötet. Auf diese Weise wird im Winter eine obere Ausbreitungsgrenze festgelegt, welche im Frühjahr, wenn der Populationsdruck die Tiere in unbesetzte Regionen des Pfahles treibt, wieder weiter nach oben verschoben wird (NAIR und LEIVESTAD).

KÄHLER (1970) wies bei dem marinen Oligochaeten *Enchytraeus albidus*, der häufig im Strandanwurf vorkommt, eine hohe Gefrierresistenz nach. Sie war bei solchen Tieren am größten, die in der Kälte bei hohem Salzgehalt gehalten worden waren.

Die genannten Untersuchungen der einzelnen Autoren lassen erkennen, daß marine litorale Tiere eine unterschiedliche Fähigkeit zum Ertragen des Frosts besitzen, welche im Winter in der borealen und arktischen Region die obere Grenze des Existenzbereiches entscheidend bestimmen kann. THEEDE (1965) wies an marinen Muscheln nach, daß auch bei isolierten überlebenden Geweben verschiedener Arten eine unterschiedliche Resistenz gegenüber den Wirkungen des Gefrierens und Auftauens ausgebildet ist.

Das Auftreten einer zellulären Gefrierresistenz bei marinen Lamellibranchierarten soll weiter analysiert werden. Wichtig erscheinen mir zunächst vergleichende Untersuchungen über das Ausmaß, und die Verbreitung dieser

Resistenz eigenschaft und deren Beziehung zum ökologischen Verhalten der Arten. Diese in erster Linie der analytischen marinen Biographie geltenden Untersuchungen münden in die Frage nach den Ursachen für die unterschiedliche Resistenz der verschiedenen Arten. Wenig ist auch über den Einfluß innerer und äußerer Faktoren und über die Auswirkungen von Adaptationen auf die zelluläre Gefrierresistenz bekannt. Deshalb soll die Aufmerksamkeit ebenfalls diesen Fragen gelten.

Auch die Abkühlungsresistenz mariner Evertebraten, insbesondere auf zellulärer Ebene, ist wenig untersucht. Abkühlung des Meerwassers kann besonders auf tropische und subtropische Meerestiere bereits bei Temperaturen, die noch wesentlich über dem Nullpunkt liegen, letal wirken. Verschiedene ältere Autoren berichten von Schäden an zahlreichen Arten, die durch Kälteeinbrüche im Küstenbereich von Florida, den Bermuda-Inseln und von Texas hervorgerufen wurden (Literatur bei GUNTER, 1957). Wie VERNBERG & VERNBERG (1970) im Laborexperiment zeigen konnten, sterben zahlreiche Crustaceen und Mollusken, deren Verbreitungsgebiet sich an der amerikanischen Küste von Nordkarolina bis in die Tropen erstreckt, bei einer Wassertemperatur von $+10^{\circ}\text{C}$ schon innerhalb von 48 h ab. Nach CRISP (1964a, b), COURTNEY & WEBB (1964) und ZIEGELMEIER (1964) wurden während des langanhaltenden Winters 1962/63 zahlreiche marine Bodentiere in der Nordsee in ihrem Bestand dezimiert. An der englischen Küste war die Mortalität unter den mehr südlichen oder lusitanischen Arten größer als unter den keltischen, am geringsten war sie unter den arktisch-borealen Faunenelementen (CRISP 1964a). Nach ZIEGELMEIER (1964) erlitten in der Nordsee um Helgoland besonders Lamellibranchier hohe Verluste, während Crustaceen und Polychaeten den kalten Winter wesentlich besser überstanden. Dabei waren jüngere Formen meist toleranter als die älteren. In kurzfristigen Abkühlungsexperimenten, in denen auch mit unterkühltem Meerwasser gearbeitet wurde, konnten an isolierten Gewebestücken artbedingte Unterschiede für den Eintritt der Kältestarre nachgewiesen werden, die Beziehungen zur Verbreitung und

zum ökologischen Verhalten der Arten erkennen lassen (SCHLIEPER et al., 1967). Danach kann offensichtlich auch die zelluläre Abkühlungsresistenz niederer mariner Evertebraten mit zur ökologisch-physiologischen Charakterisierung der Arten herangezogen werden, wie es bereits bei der zellulären Hitzeresistenz poikilothermer Tiere von zahlreichen Autoren durchgeführt worden ist (Literatur bei ANDRONIKOV et al., DREGOLSKAYA, DZHAMUSOVA, RUMYANTSEV, SCHLIEPER, ZHIRMUNSKY, USHAKOV, in TROSHIN, 1967).

Bei vielen litoralen und sublitoralen Arten wurden enge Beziehungen zwischen der Resistenz gegenüber hohen Letaltemperaturen und ihrer geographischen und vertikalen Verbreitung nachgewiesen. Unter den älteren Arbeiten seien in diesem Zusammenhang nur die Untersuchungen von HENDERSON (1929) an Lamellibranchiern und die von BROEKHUYSEN (1940) an Gastropoden von verschiedenen litoralen Vorkommensbereichen genannt. Weitere Literatur zu diesem Thema wird ausführlich bei GUNTER (1957), KINNE (1963) und NEWELL (1970) zitiert. Nach ZHIRMUNSKY (1967) weisen Arten, die in einem ähnlichen Temperaturbereich vorkommen, eine ähnliche Hitzestabilität ihrer homologen Gewebe und Zellen auf. Es können sogar verschiedene Biozönosen durch die zelluläre Hitzeresistenz ihrer charakteristischen Arten gekennzeichnet werden. Unter den marinen Evertebraten ein und desselben Standortes ist zum Beispiel die zelluläre Hitzeresistenz bei den litoralen Arten größer als bei denen des Sublitorals. (Literatur bei : SCHLIEPER, 1966; ZHIRMUNSKY, 1967). Zu berücksichtigen bleibt, daß die zelluläre Hitzeresistenz durch verschiedene innere und äußere Faktoren beeinflusst werden kann (Literatur bei PRECHT et al., 1966; SCHLIEPER, 1966; USHAKOV, 1968) und wahrscheinlich bei eurythermen Arten der Spielraum für adaptative Änderungen der zellulären thermischen Resistenz größer ist als bei stenothermen Formen (SCHLIEPER, 1960, 1966; VERNBERG et al., 1963). Nach USHAKOV (1964, 1966, 1968) ist die zelluläre Hitzeresistenz in erster Linie durch die Stabilität thermolabiler Proteinkomplexe des Protoplasmas bedingt.

In dieser Arbeit wird die Hitzeresistenz^{nur} bei solchen Arten und Populationen untersucht, bei denen auch die zelluläre Gefrier- oder Abkühlungsresistenz bestimmt wird, so daß obere und untere thermische Resistenzgrenzen miteinander verglichen werden können.

Da neuere Befunde darauf hinweisen, daß einerseits die zellulären Hitze- und Kälteschäden (vgl. z.B. MERYMAN, 1966; ROSE, 1967) und andererseits die Mechanismen der adaptiven Veränderungen der Hitze- und Kälteresistenz verschieden sind (VOGEL 1966; PRECHT et al., 1966; BASEDOW, 1968; KÄHLER, 1970), soll die Aufmerksamkeit auch einzelnen Faktoren gelten, die Veränderungen der thermischen Resistenz hervorrufen, sowie den Mechanismen dieser Resistenzänderungen. Bei den Schäden, die durch Kälte hervorgerufen werden, kann man Effekte von Abkühlung allein, ohne damit verbundenem Einfrieren, und von extrazellulärer und intrazellulärer Eisbildung unterscheiden. Je nachdem, auf welcher dieser Stufen Resistenz vorliegt, dürfte sie, mindestens zum Teil, auf unterschiedliche Resistenzmechanismen zurückzuführen sein.

B. TIERMATERIAL

Für die Untersuchungen wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Lamellibranchierarten herangezogen. Das Marine Laboratory Woods Hole/Mass. beschaffte die Versuchstiere vom Kap Cod und schickte sie mir per Air-Express nach Miami. Mitarbeiter des Duke Marine Laboratory in Beaufort/N.C. sammelten Amerikanische Austern vom Kap Hatteras, welche ich per Flugzeug nach Miami mitnahm. Die aus dem Küstenbereich von Florida stammenden Muschelarten konnten von Booten des Institute of Marine Science in Miami aus gefangen werden. Die Arten von der deutschen Nordseeküste kamen aus dem Watt bei Büsum. *Spisula* wurde aus 15-50 m Tiefe von der Biologischen Anstalt Helgoland beschafft. Die Muscheln aus der Ostsee, *Abra alba* und *Cyprina islandica*, entstammten den küstenfernen Weichböden der Kieler Bucht. *Mytilus edulis* wurde von Brückenpfählen am Rande der Kieler Förde geholt. *Modiolus modiolus* wurde im südlichen Kattegat in 15-50 m Tiefe gedredht. Die dänische Limfjord-Oysters-Company (Nykøbing-Mors) lieferte *Ostrea* aus dem Limfjord.

Bis zum Beginn der Experimente wurden die Versuchstiere 1-3 Wochen in belüfteten Aquarien bei gleichbleibendem Salzgehalt und konstanter Temperatur gehalten. Die Bedingungen der Anpassungsexperimente werden bei der Beschreibung der Ergebnisse im einzelnen genannt.

Tabelle 2

Untersuchte Lamellibranchierarten
a) von der amerikanischen Ostküste

Art	Fundort
<i>Mytilus edulis</i> L.	Kap Cod/Mass.
<i>Macoma balthica</i> L.	" "
<i>Modiolus demissus</i> DILLWYN	" "
<i>Crassostrea virginica</i> GMELIN	Kap Cod/Mass. Kap Hatteras/N.C. Süd-Florida
<i>Brachidontes exustus</i> L.	West-Florida
<i>Chione cancellata</i> L.	Südost-Florida
<i>Chama macrophylla</i> GMELIN	" "
<i>Laevicardium laevigatum</i> L.	" "
<i>Asaphis deflorata</i> L.	" "
<i>Aequipecten gibbus nucleus</i> BORN.	" "
<i>Isognomon alatus</i> GMELIN	" "

b) aus europäischen Küstengewässern

	Nordsee (bei Büsum)	Ostsee (Kieler Förde)
<i>Mytilus edulis</i> L.		
<i>Cardium edule</i> L. = <i>Cerastoderma edule</i> (L.) ¹⁾	"	"
<i>Mya arenaria</i> L. = <i>Arenomya arenaria</i> (L.) ²⁾	"	"
<i>Macoma balthica</i> (L.)	"	"
<i>Modiolus modiolus</i> (L.)	Kattegat	
<i>Cyprina islandica</i> (L.) ³⁾	Kieler Bucht	
<i>Ostrea edulis</i> L.	Limfjord	
<i>Spisula solida</i> (L.)	Deutsche Bucht (Nordsee)	
<i>Abra alba</i> (WOOD)	Kieler Bucht	

- 1) *Cerastoderma* (POLI 1795) MÖRCH 1853. Typus : *edule* (LINNÉ 1758)
 2) *Arenomya* WICKWORTH 1930. Typus : *arenaria* (LINNÉ 1758), nach
 3) *Arctica* SCHUMACHER 1817 = *Cyprina* LAMARCK 1818. Typus : *islandica*
 Angaben über die Verbreitung nach : ABBOTT(1954), WARMKE and

Verbreitungstyp	Verbreitungsgebiet an der amerikan. Ostküste
arktisch-boreal kosmopolitisch	Atl. Arktis bis Kap Hatteras (kl. Exemplare vorübergehend bis Südkarolina)
arktisch-boreal boreal	Atl. Arktisch bis Georgia Mündung des St. Lorenzstromes bis Südkarolina
subtrop.-boreal	Bucht des St. Lorenzstromes Karibisches Meer Golf v. Mexiko
subtrop.-trop.	Nordkarolina bis Karibisches Meer
subtrop.-trop.	" " "
subtrop.-trop.	" " "
subtrop.-trop.	" " "
subtrop.-trop.	Bermuda-Inseln-Südost-Florida- Karibisches Meer
subtrop.-trop.	Südost-Florida-Karibisches Meer
tropisch	Südhälfte von Florida- Karibisches Meer
	im europäischen Bereich
arktisch-boreal kosmopolitisch	Nördl. Eismeer bis Nordafrika, auch Ostsee
lusitanisch-boreal	Nord-Norwegen bis Marokko u. Kanaren, auch Ostsee
boreal-zirkumpolar	Nordsee, auch Ostsee
arktisch-boreal	Nord-Norwegen-Kanal, auch Ostsee
boreal-zirkumpolar	Nordsee, südl. bis Brest, Kattegat, Beltsee
subarktisch-boreal	Nordatlantik-Lus. Meer, Beltsee
lusitanisch-boreal	Mittelnorwegen bis Spanien Mittelmeer, Schw. Meer
lusitanisch-boreal	Nordnorwegen u. Island bis Mittelmeer
lusitanisch-boreal	Lofoten-Azoren-Westafrika, Mittelmeer, Westl. Ostsee

(LINNÉ 1767), nach NORDSIECK (1969).

1758), nach NORDSIECK (1969).

ypus : islandica (LINNÉ 1767)

ARMKE and ABBOTT (1962), NORDSIECK (1969), STRESEMANN (1957).

C. METHODEN

Für die vergleichenden Resistenzmessungen an isoliertem Kiemenepithel verschiedener Lamellibranchierarten wurden jeweils Gewebestücke aus dem ventralen Rand im mittleren Bereich der Kiemenlamellen herauspräpariert. Um möglichst einheitliches Versuchsmaterial zur Verfügung zu haben, wurden die vorderen und hinteren Enden der Kiemen nicht verwendet. Vor den Versuchen wurden alle Gewebestücke mikroskopisch bei 60- bis 80facher Vergrößerung betrachtet. Es wurden dann grundsätzlich nur solche Kiemenstücke verwendet, die sich als einwandfrei erwiesen. Die Größe der etwa quadratischen Stücke schwankte zwischen 2 bis 4 mm Kantenlänge. In Kontrollversuchen konnten keinerlei Auswirkungen dieser Größenschwankungen auf die Resistenz festgestellt werden. Zu den Untersuchungen der Gefrierresistenz wurden wegen der dabei benutzten geringen Flüssigkeitsmengen die kleineren, bei der Ermittlung der Abkühlungsresistenz und der Hitze-resistenz die etwas größeren Stückchen bevorzugt.

Die Aktivität der terminalen Randcilien diente bei den einzelnen Resistenzuntersuchungen als Kriterium für den Schädigungsgrad und für die Überlebensdauer. Die Cilienaktivität einzelner Kiemenstücke wurde dabei in folgender Weise mit den Bewertungsziffern von 3 bis 0 gekennzeichnet :

- 3 : Cilienaktivität normal,
- 2 : Cilienaktivität etwas verringert,
- 1,5 : Cilienaktivität um die Hälfte verringert,
- 1 : Cilienaktivität um mehr als 50% verringert,
- 0,5 : Cilienaktivität sehr stark verringert,
- 0 : Stillstand der Cilien (weniger als 1% der Cilien noch schwach aktiv).

Diese Abstufung ergab sich durch weitere Untergliederung des von SCHLIEPER et al. (1960) und RESHÖFT (1961) benutzten Schemas für die Abschätzung der Cilienaktivität bei Resistenzbeobachtungen. Sie wurde auch von THEEDE (1965), THEEDE & LASSIG (1967), THEEDE et al. (1969) und THEEDE und PONAT (1970) benutzt. Durch

Mittelwertbildung können sich Zahlenwerte ergeben, die zwischen den direkt zu beobachtenden Werten liegen. Die Mittelwerte, aus jeweils 8-10 Einzelwerten gebildet, sind gut reproduzierbar und meist mit einer geringeren Standardabweichung als $\pm 0,5$ behaftet. Da jedoch die Bewertungsziffern für die relative Cilienaktivität bzw. den Schädigungsgrad der Gewebe geschätzte Charakterisierungen darstellen, wurde in Abbildungen und Tabellen auf die Angabe der Standardabweichungen verzichtet.

Gefrierresistenz

Die von THEEDE (1965) beschriebene Untersuchungsmethode konnte verbessert werden. Nach der Vorbehandlung der Tiere (siehe Kap. ERGEBNISSE) wurden die Kiemen herauspräpariert und jeweils 8-10 isolierte Kiemenrandstücke von verschiedenen Individuen einer Art in kleine durchsichtige Becher aus Polyäthylen (4 cm breit, 7 cm hoch) überführt, die 0,5 ml Versuchsmedium enthielten. Die Becher wurden verschlossen und bis dicht unter den Deckelrand in die Kühlflüssigkeit (Gemisch aus Äthylenglycoll und destilliertem Wasser) eines COLORA-Flüssigkeitskühlers hineingehängt. Eine Umwälzpumpe hielt die Flüssigkeit kräftig in Bewegung, wodurch in jedem Falle ein schneller Temperatúrausgleich herbeigeführt wurde. Mit Hilfe eines Thermistors konnte der Temperaturverlauf in den Proben während des Gefrier- und Auftauvorganges unter Kontrolle gehalten werden. Zur Anzeige diente dabei das Universal-Temperaturmeßgerät nach KNAUER (Berlin) in Verbindung mit einem Servogor-Kompensationsschreiber. Beispiele für Registrierungen des Temperaturverlaufs in den Probenbechern bei Verwendung unterschiedlicher Kühlbadtemperaturen sind in Abb. 1 wiedergegeben. Wenn das Gefrieren des Versuchsmediums nicht innerhalb einer Minute nach Überführung in das Kältebad eingesetzt hatte, wurde es gleich danach durch "Impfen" mit Eiskristallen ausgelöst. Zu diesem Zweck waren in den Deckeln der Versuchsbekälter kleine Öffnungen vorhanden. Nach dem Gefrieren und dem damit verbundenen mehr oder weniger starken

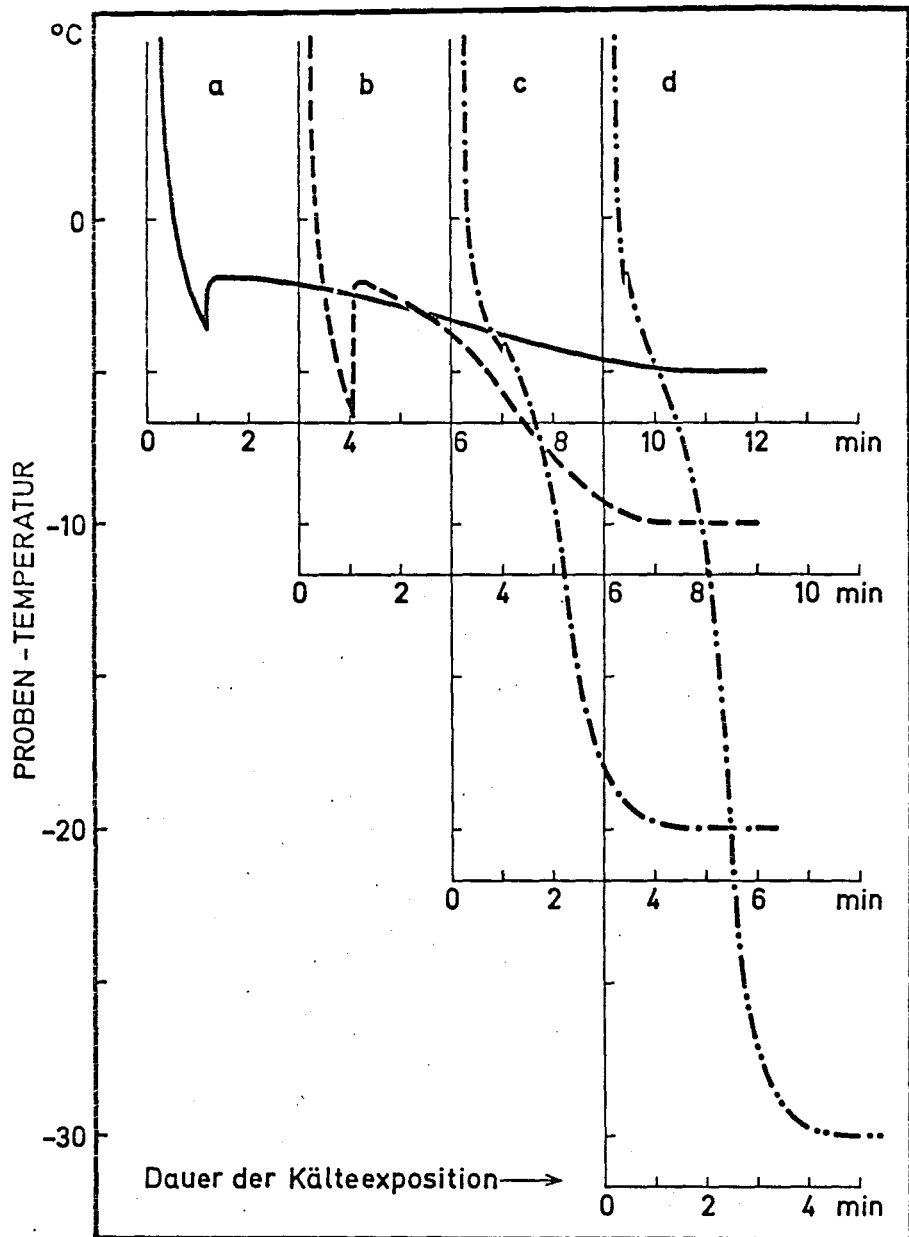


Abb. 1 : Charakteristische Temperaturverläufe bei den Gefrierresistenz-Versuchen. Messungen in den Proben während der Exposition bei folgenden Kühlbadtemperaturen : a) -5°C , b) -10°C , c) -20°C , d) -30°C . Ein Probenbehälter (4 cm ϕ , 7 cm hoch) enthielt jeweils 0,5 ml Meerwasser von $30^{\circ}/\text{oo}$ S und 8 Kiemenstücke. Bei den Versuchen zu a und b wurde das schnelle Einsetzen des Gefrierens durch "Impfen" mit Eiskristallen ausgelöst.

Anstieg der Temperatur. sank diese in den Proben innerhalb weniger Minuten auf die der Kühlflüssigkeit ab. Die Gewebeportionen wurden dann unterschiedlich lange im gefrorenen Zustand gehalten, bis sie in zweckmäßig erscheinenden Abständen aus der Kühlflüssigkeit herausgenommen und schnell aufgetaut wurden. Letzters geschah, indem die Probenbecher jeweils in ein vorbereitetes Wasserbad von Zimmertemperatur (etwa 20°C) eingetaucht wurden und gleichzeitig von oben her Versuchsmedium derselben Temperatur hinzugegeben wurde. Das Auftauen und der Temperatúrausgleich waren auf diese Weise nach etwa 15-20 Sekunden erreicht. Jeweils zwischen 5 und 10 Minuten danach wurden die Gewebestücke bei 120facher Vergrößerung bei Zimmertemperatur beobachtet. In einigen Versuchsreihen wurde die Reaktionsweise der Gewebestücke (Erholung bzw. weitere Schädigung) über mehrere Stunden nach erfolgtem Auftauen weiter verfolgt. Die Aktivität der terminalen Randcilien sowie Zerfallerscheinungen an den Gewebestücken dienten zur Beurteilung des Schädigungsgrades. Die Ergebnisse aus jeweils 8-10 Einzelbeobachtungen an Gewebestücken von verschiedenen Tieren wurden dann zu Mittelwerten zusammengefaßt. Bei der graphischen Darstellung dieser Mittelwerte erwies es sich oft als zweckmäßig, ein semilogarithmisches Koordinatensystem zu verwenden. Auf der Abszisse wurde in logarithmischen Einheiten jeweils die Expositionsdauer in der Kälte, auf der Ordinate die anschließend bei Zimmertemperatur ermittelte relative Cilienaktivität, das Maß für den Schädigungsgrad, eingetragen. Es ergab sich dann bei einer konstanten letalen Temperatur (z.B. -10°C) in den meisten Fällen eine gleichmäßige Zunahme der Gewebeschädigung in einem annähernd logarithmischen Sinne, die sich in Form von Geraden darstellen ließ. In einigen Tabellen wurde der Verlauf solcher Geraden durch die Angaben von zwei Werten beschrieben, durch die Zeit, nach der die Cilienaktivität um 50% reduziert war und die Zeit, nach der absoluter Stillstand des Cilienschlages ermittelt worden war.

Bei einer größeren Zahl von Experimenten wurde die Dauer der Kälteexposition ermittelt, nach der noch 50% der Gewebestücke überlebten (LD_{50} -Zeit). Als letal geschädigt galten solche Kiemenstücke, an denen nach Einfrieren, Auftauen und anschließender Erholungsdauer von 5-10 min bei Zimmertemperatur keine Cilienaktivität mehr festgestellt werden konnte. Fast immer trat in diesem Stadium auch kräftiger Gewebeerfall ein. Die Dauer der Kälteexposition bei den Versuchen wurde so gewählt, wie es auf Grund von ^{Vor}versuchen als zweckmäßig erschien. In den Proben wurde der prozentuale Anteil der überlebenden Stücke festgestellt. Drei bis vier solcher Werte, die jeweils aus Beobachtungen an 20 Gewebestücken ermittelt worden waren, wurden auf semilogarithmischem Papier in Abhängigkeit von der Kälteexposition aufgetragen. Dieser graphischen Darstellung wurden dann die LD_{50} -Zeiten entnommen.

Abkühlungsresistenz

Die Abkühlungsresistenz isolierter Kiemenstücke wurde auf zweierlei Weise vergleichend untersucht, bei gleichmäßiger Temperaturerniedrigung ($1^{\circ}\text{C}/\text{min}$; im Prinzip ähnlich PRECHT & CHRISTOPHERSEN, 1965; PRECHT et al., 1966) und bei konstanter Kälte (-3° oder -5°C). Bei der ersten Methode dienten die Aktivität und der Eintritt der Kältestarre der terminalen Randcilien als ein Maß für die Abkühlungsresistenz. Zu den Beobachtungen wurde eine Versuchsanordnung benutzt, die im einzelnen bei SCHLIEPER, FLÜGEL u. THEEDE (1967) beschrieben ist und auch von THEEDE u. LASSIG (1967) verwendet wurde. Die zu untersuchenden Gewebestückchen befanden sich dabei im inneren Teil einer mit Meerwasser gefüllten, oben offenen und unten durchsichtigen PVC-Doppelkammer und konnten mikroskopisch bei 60-120facher Vergrößerung beobachtet werden. Sie waren mit Hilfe von Glasfäden und Hahnfett auf einem kleinen Polyäthylentischchen befestigt. Dadurch wurde erreicht, daß sie nicht direkt am Boden der Versuchskammer lagen, wo ein

Temperaturgefälle zur äußeren Kammer hätte bestehen können. Durch den äußeren Teil der verwendeten Doppelkammer wurde Kühlflüssigkeit aus einem Colera-Flüssigkeitskühler oder aus einem mittels Eintauchkühler hergestellten Kältebad hindurchgepumpt, wobei die Durchstromgeschwindigkeit während des Versuchs mit einer Schlauchklemme reguliert werden konnte. In der inneren Kammer hielt ein von oben eingeführter Rührer das Medium in Bewegung, um eine gleichmäßige Temperaturverteilung und eine ausreichende O_2 -Versorgung sicherzustellen.

Eine weitere Methode zur Bestimmung der Abkühlungsresistenz bestand darin, die Überlebensfähigkeit der isolierten Gewebestücke bei konstanter niedriger Temperatur (z.B. $-3^{\circ}C$) zu ermitteln, bei der normales Meerwasser lange im unterkühlten Zustand ohne Eisbildung gehalten werden kann. Hierzu wurde der Boden eines Plastikbehälters (Grundfläche 9×9 cm), der in einem Kühlbad hing, in 9 Fächer unterteilt, und in jedem Fach wurden wiederum 10 Kiemenstückchen untergebracht. Ein Rührer hielt das Medium ständig in Bewegung. In zweckmäßig erscheinenden Abständen wurden die Gewebestücke jeweils aus einem Fach herauspipettiert und zur Erholung 15 min bei $+10^{\circ}C$ gehalten. Danach wurden der Aktivitätszustand und der Anteil der überlebenden Stücke festgestellt. In einzelnen Fällen wurde auch die Abkühlungsresistenz bei $-5^{\circ}C$ ermittelt. Hierzu wurde dieselbe Anordnung wie bei den Gefrierresistenz-Versuchen benutzt.

Hitzeresistenz

Vergleichende Untersuchungen zur Hitzestabilität isolierter Kiemenstücke wurden bei gleichmäßiger Erwärmung (Temperaturanstieg $1^{\circ}C/5$ min) sowie bei konstanter letaler Hitze ($36^{\circ}C$) ausgeführt. Nach beiden Methoden wurde bereits von zahlreichen Autoren gearbeitet (zur Literatur vgl. PRECHT et al., 1966, SCHLIEPER, 1966). Bei dem ersten Verfahren diente die Temperatur, bei der die Hitzestarre der Kiemencilien eintrat, als Maß für die Hitzestabilität. Bei konstanter Hitzeeinwirkung ($36^{\circ}C$) war die

Zeit bis zum Eintritt der Hitzestarre das Maß für die Resistenz. Zu den Untersuchungen wurde eine auf einem Mikroskoptisch montierte Doppelkammer benutzt, welche auch bei der Bestimmung der Abkühlungsresistenz Verwendung fand. Während ein Thermomix-Gerät ständig temperiertes Wasser durch die äußere Kammer hindurchpumpte, hielt in der inneren Kammer ein Rührer das Medium in Bewegung. Die Temperatur wurde laufend mit Hilfe eines Quecksilberthermometers (Ablesegenauigkeit $1/10^{\circ}\text{C}$) kontrolliert. Bei der ersten Methode wurden die Gewebe in Abständen von $0,5^{\circ}$ oder 1°C , bei der zweiten Methode alle 1-2 min mikroskopisch beobachtet. Die in den Tabellen und Abbildungen wiedergegebenen Werte beruhen auf den Ergebnissen an jeweils mindestens 8 Gewebestücken. Standardabweichungen wurden nach SCHLIEPER (1965) berechnet.

Abkürzungen : AT = Anpassungstemperatur,
AS = Anpassungssalzgehalt.

Enzymaktivitäten

Eine genau definierte Menge isolierten Kiemen-
webes - nähere Angaben in den Legenden zu den Tabellen
und Abbildungen des Kapitels D.III. - wurde in einer be-
kannten Menge Meerwasser bestimmte Zeit bei verschiedenen
Kühlbadtemperaturen eingefroren. Der Temperaturverlauf
in der Probe während des Abkühlungs- und Einfrierpro-
zesses wurde, wie auf S. 11 beschrieben, kontinuierlich
registriert. Nach dem Herausnehmen der Versuchsbehälter
aus dem Kühlbad und Auftauen des Inhaltes im Wasserbad
bei etwa +20°C innerhalb eines Zeitraumes von 10 min
wurde die Probe bei ~3.500 U/min zentrifugiert und der
Überstand abpipettiert. In dieser Flüssigkeit wurden dann
die Aktivitäten der aus dem Cytoplasma der Zellen ausge-
tretenen Aldolase und aus den Lysosomen stammenden sauren
Phosphatase bei 25°C gemessen.

Aldolase

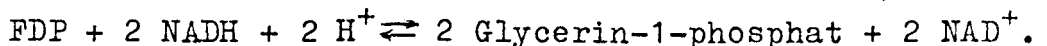
Die Aktivitätsbestimmung der aus den Zellen ausge-
tretenen Fructose-1,6-diphosphat-Aldolase (ALD) nach
Schädigung der Zellmembranen durch Einfrieren und Auf-
tauen erfolgte in Anlehnung an BEISENHERZ et al. (1953)
unter Verwendung der Biochemica-Testkombination TC-D
(Best. Nr. 15974, BOEHRINGER/Mannheim).

Aldolase katalysiert folgende Reaktion :

Fructose-1,6-diphosphat (FDP) \rightleftharpoons Dihydroxyacetonphosphat
(DAP) + D-Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP).

Durch die Wirkung von Triosephosphat-Isomerase (TIM)
wird das Gleichgewicht zwischen den beiden entstehenden
Triosephosphaten ganz zum DAP hin verschoben. Im weiteren
Verlauf der Reaktionen, die der Bestimmungsmethode zu-
grunde liegen, wird das aus FDP gebildete DAP durch die
katalytische Wirkung von Glycerin-1-phosphat-Dehydrogenase
(GDH) mit NADH in Glycerin-1-phosphat überführt, wobei
NADH in NAD⁺ übergeht.

Die Gesamtreaktion läßt sich formulieren als :



Aus der photometrisch bestimmten NADH-Abnahme wird dann auf die Aldolase-Aktivität geschlossen. Der von BOEHRINGER für die Untersuchung von Blutseren zusammengestellte Testansatz konnte beibehalten werden. Die Messungen wurden mit dem ZEISS-Spektralphotometer PMQ II bei 366 nm durchgeführt. Die Schichtdicke der Küvette betrug 1 cm. Die in den Versuchen ermittelten Extinktionswerte als Maß für die Aktivität der aus den Zellen ausgetretenen Aldolase wurden bei gleichbleibenden Versuchsansätzen (10% Gewebe + 90% Meerwasser) direkt miteinander verglichen.

Saure Phosphatase

Die Messung der Aktivität der aus dem Gewebe ausgetretenen sauren Phosphatase (SP) erfolgte nach BERGMAYER (1962) mit Hilfe der MERCK-Testansätze (Best. Nr. 3305, E. MERCK, Darmstadt).

Der Bestimmung liegt folgende Reaktion zugrunde :

Durch Phosphatase wird p-Nitrophenylphosphat in p-Nitrophenol und Phosphorsäure gespalten. Die pro Zeiteinheit gebildete Menge p-Nitrophenol ist der Phosphataseaktivität proportional. Durch Zusatz von 0,02 n NaOH wird die Enzymreaktion unterbrochen. Gleichzeitig geht das entstandene p-Nitrophenol in das gelb gefärbte Anion über, das photometrisch bei 405 nm bestimmt wird. Die Messungen erfolgten bei pH 4,8 und 25°C. Die Inkubationszeit betrug 30 min.

D. ERGEBNISSE

I. Artspezifische Unterschiede der zellulären thermischen Resistenz und ihre Beziehungen zum ökologischen Verhalten und zur geographischen Verbreitung der Arten

1) Gefrierresistenz

Die Gefrierresistenz des isolierten Kiemengewebes mariner Muscheln aus der Nordsee ist nach THEEDE (1965) umso größer, je stärker exponiert die Arten im Litoral vorkommen (Tab. 3). Bei der Miesmuschel *Mytilus edulis* ist sie am größten, weniger ausgeprägt bei im Sediment lebenden und damit geschützteren Formen (*Cardium edule*, *Macoma balthica*, *Mya arenaria*), am geringsten jedoch bei Arten, die auf tiefere Wasserschichten beschränkt sind (*Modiolus modiolus*, *Spisula solida*).

Zum Vergleich mit diesen Arten von der deutschen Nordseeküste konnten auch solche von der nordamerikanischen Atlantikküste untersucht werden. Es handelt sich dabei um Lamellibranchier von der Südwest- und Ostküste von Florida, aus Beaufort (Nordkarolina) und vom Kap Cod (Massachusetts). Bei den Muscheln aus Miami bzw. Südflorida weisen Vertreter aus 2 Gattungen eine nennenswerte Gefrierresistenz auf : Austern (*Crassostrea*) und subtropische Verwandte der Miesmuschel (*Brachidontes*) (vgl. Tab. 4). Wegen der starken Abhängigkeit der Gefrierresistenz vom Salzgehalt und von der Anpassungstemperatur wurden die Versuchstiere vor den Resistenzmessungen zwei Wochen bei konstanten Temperatur- und Salzgehaltsbedingungen gehalten. Die Amerikanische Auster *Crassostrea virginica* hat von den untersuchten Muschelarten die höchste Gefrierresistenz. Diese Eigenschaft, die von den nördlichen Populationen dieser Art zum Überwintern im Eulitoral benötigt wird, ist auch bei den in Südflorida lebenden Individuen erhalten geblieben, obwohl sie keine Verwendung dafür haben. Die Resistenzwerte der warmangepaßten Tiere (AT 23,5°C) liegen in derselben Größenordnung wie die Sommerwerte der Gefrierresistenz bei unserer Miesmuschel *Mytilus edulis* aus der Nordsee

Tabelle 3

Artspezifische Unterschiede der zellulären Gefrierresistenz isolierter Kiemenstücke verschiedener Muschelarten aus der Nordsee. (Nach Einfrieren des isolierten Kiemengewebes bei -10°C , anschließendem Auftauen und jeweils 10 min Erholungsdauer bei etwa 20°C wurde die Cilienaktivität als Maß für den Schädigungsgrad beobachtet.

Salzgehalt : $30^{\circ}/\text{oo}$.

Versuchszeit : Winter 1964/65). Nach THEEDE, 1965.

A r t e n	50% der normalen Cilienaktivität wurde nach folgender Expositions-dauer (in Minuten) bei -10°C gefunden	Vollständiger Stillstand der Kiemencilien wurde nach folgender Expositions-dauer (in Minuten) bei -10°C gefunden
<i>Mytilus edulis</i>	120	330
<i>Cardium edule</i>	65	210
<i>Mya arenaria</i>	42	90
<i>Macoma balthica</i>	35	100
<i>Modiolus modiolus</i>	3,5	6
<i>Ostrea edulis</i>	3	5,5
<i>Spisula solida</i>	2	4

(Überlebensdauer des isolierten Kiemengewebes bei -10°C bis zu 1 Stunde). Nach Kaltanpassung (AT 5°C) liegt die Höhe der zellulären Gefrierresistenz zwischen der von *Cardium edule* und *Mya arenaria*. Zwischen Austern (*Crassostrea virginica*) aus Miami und solchen vom Kap Hatteras und vom Kap Cod bestehen nach längerer Anpassung an niedrige Temperaturen in bezug auf die zelluläre Gefrierresistenz praktisch keine Unterschiede. Bei Exemplaren von allen drei Fundorten wurde im Experiment durch 14tägige Anpassung an $+5^{\circ}\text{C}$ annähernd dieselbe hohe Gefrierresistenz erreicht (vgl. auch Kap. II. 2).

Erstaunlich und für mich unerwartet war das Vorkommen einer für Muschel-Gewebe relativ hohen Gefrierresistenz bei der subtropischen Art *Brachidontes exustus*. Ihr Verbreitungsgebiet erstreckt sich von Nordkarolina im Norden bis zu den Westindischen Inseln im Süden. Diese litorale Muschel weist gleichzeitig auch eine hohe Resistenz

Tabelle 4

Artspezifische Unterschiede der zellulären Gefrierresisten isolierter Kiemenstücke mariner Muschelarten von verschiedenen geographischen Standorten. (Nach Einfrieren des isolierten Kiemengewebes bei -10°C , anschließendem Auftaue und jeweils 10 min Erholungsdauer bei Zimmertemperatur von $20-23^{\circ}\text{C}$ wurde die Cilienaktivität als Maß für den Schädigungsgrad beobachtet. Vor den Resistenzmessungen wurden die Versuchstiere 14 Tage bei den angegebenen Anpassungsbedingungen gehalten.)

Herkunft, Versuchszeit, Anpassungs- bedingungen, Arten	50% der nor- malen Cilien- aktivität wurde nach folgender Expositions- dauer (in Minuten) bei -10°C gefunden	Vollständiger Stillstand der Kiemencilien wurde nach folgender Expositions- dauer (in Minuten) bei -10°C gefunden	LD ₅₀ -Zei bei -10° (min)
Nordsee			
Jan./Febr. 1969			
AT 5°C , $30^{\circ}/\text{ooS}$			
<i>Mytilus edulis</i>	128	345	285
<i>Cardium edule</i>	64	215	155
<i>Mya arenaria</i>	46	85	76
<i>Macoma balthica</i>	41	94	73
Nordsee			
Mai/Juni 1969			
AT 15°C , $30^{\circ}/\text{ooS}$			
<i>Mytilus edulis</i>	28	75	52
<i>Cardium edule</i>	10	32	24
<i>Mya arenaria</i>	8	25	17
<i>Macoma balthica</i>	7	25	18
Florida			
Okt./Nov. 1967			
AT $23,5^{\circ}\text{C}$, $32,3^{\circ}/\text{ooS}$			
<i>Crassostrea virginica</i>	27	80	60
<i>Brachidontes exustus</i>	8	20	16
<i>Isognomon alatus</i>	4	7	6
<i>Chione cancellata</i>	3,5	6	5
<i>Asaphis deflorata</i>	2	4	3,5
<i>Chama macrophylla</i>	< 1	3	2,5
Florida			
Nov./Dez. 1967			
AT 5°C , $32,3^{\circ}/\text{ooS}$			
<i>Crassostrea virginica</i>	70	130	115
<i>Brachidontes exustus</i>	10	35	24

gegenüber anderen extremen abiotischen Umweltfaktoren auf. In der oberen Gezeitenregion erträgt sie beträchtliche Aussüßung durch Regen, im Sommer starke Sonneneinstrahlung im Winter auch geringe selten eintretende Eisbildung. Bei allen weiteren untersuchten Muschelarten aus Miami/Florida zeigen die isolierten Kiemengewebe keine nennenswerte Gefrierresistenz. Sie überleben bei -10°C nur wenige Minuten.

Weitere Muschelarten wurden vom etwa 2000 km nördlich gelegenen Kap Cod untersucht. Davon wurde jeweils eine Tiergruppe vor den Experimenten bei $23,5^{\circ}\text{C}$, eine andere bei 5°C gehalten. Die Ergebnisse dieser Anpassungsversuche werden im einzelnen in Kap. II. 2 beschrieben. Hier sollen nur die nach vorheriger Hälterung der Tiere bei $+5^{\circ}\text{C}$ erzielten Werte zum Vergleich herangezogen werden. In Abb. 2 wird die zelluläre Gefrierresistenz der an 5°C angepaßten Muscheln vom Kap Cod mit der von Wintertieren aus der Nordsee verglichen. Es handelt sich bei den Tieren aus der Nordsee und vom Kap Cod jeweils um Angehörige derselben Familie (*Crassostrea* und *Ostrea*, Familie *Ostreidae*), derselben Gattung (*Modiolus modiolus* und *Modiolus demissus*) und um Populationen derselben Arten (*Mytilus edulis* oder *Macoma balthica*).

Bei *Modiolus demissus*, einer Art, die weit in das obere, bei Ebbe trockenfallende Litoral vordringt, und deren Verbreitungsgebiet an der amerikanischen Atlantikküste von Südkarolina bis zur Mündung des St. Lorenzstromes reicht, ist die zelluläre Gefrierresistenz wesentlich größer als bei *Modiolus modiolus*, obwohl letztere Art ihre Verbreitungsgrenze im Norden erst in arktischen Gewässern findet. *Modiolus modiolus* ist aber auf etwas tiefere Wasserschichten beschränkt. Dieses Beispiel läßt deutlich erkennen, wie unterschiedlich die zelluläre Gefrierresistenz bei Arten derselben Gattung je nach deren Vorkommen und ökologischem Verhalten sein kann. Einen ähnlichen Unterschied ergibt auch ein Vergleich zwischen der gefrierresistenten Amerikanischen Auster, *Crassostrea virginica*, und der frostempfindlichen Europäischen Auster, *Ostrea edulis*, die beide derselben Familie angehören (Abb. 2).

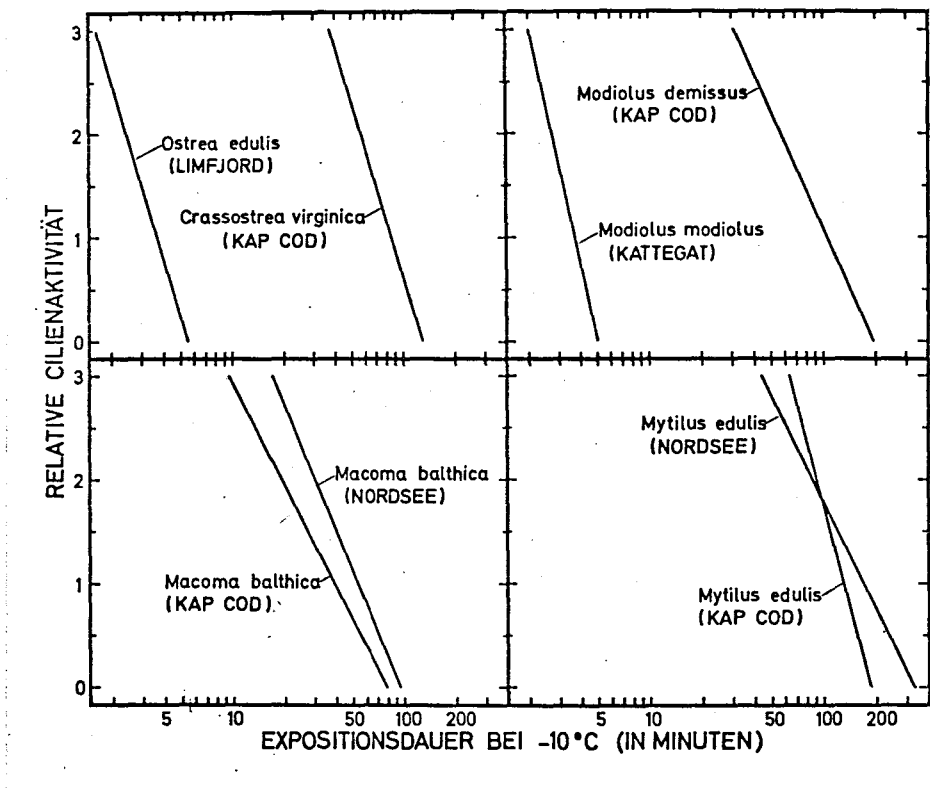


Abb.2 : Vergleich der zellulären Gefrierresistenz kaltangepaßter Muscheln vom Kap Cod (AT 5°C) mit der von Wintertieren jeweils derselben oder nahe verwandter Arten aus der Nordsee. (Werte für Nordseetiere nach Tabelle 3, für Tiere vom Kap Cod nach Abb. 10).

In Übereinstimmung mit der größeren Resistenz von *Crassostrea virginica* gegenüber Hitze und Gefrieren erstreckt sich der Vorkommensbereich dieser Art in der temperierten Region weiter ins obere Eulitoral. Außerdem dringt diese Art weiter nach Süden vor. Dagegen läßt ein Vergleich der zellulären Gefrierresistenz kaltangepaßter *Mytilus edulis* und *Macoma balthica* vom Kap Cod mit Winterwerten jeweils derselben Arten aus der Nordsee nur sehr geringe Unterschiede erkennen.

Die zelluläre Gefrierresistenz von *Macoma balthica* ist aber sowohl bei Exemplaren vom Kap Cod als auch bei denen aus der Nordsee geringer als von *Mytilus edulis*. In Übereinstimmung mit der größeren zellulären Gefrierresistenz kann *Mytilus* in der subarktischen Region vereinzelt auch im Winter lebend in der Gezeitenregion angetroffen werden. *Macoma* bleibt dort dagegen auf tiefere Wasserschichten beschränkt. Auch in der temperierten Region lebt *Macoma balthica* etwas geschützter vor der Einwirkung extremer Umweltfaktoren (Hitze, Kälte), indem sich diese Muschel in der Gezeitenregion und an tiefer gelegenen Standorten in den Boden eingräbt.

2) Abkühlungsresistenz

An marinen Muschelarten mit unterschiedlichen Vorkommensbereichen wurde die Reaktion von isoliertem Kiemen- gewebe auf allmähliche Abkühlung (Abb.3) und außerdem die Überlebensfähigkeit des Gewebes bei konstanter niedriger Temperatur untersucht (Tab.5). Die Beobachtungen der Cilienaktivität bei gleichmäßiger Temperaturerniedrigung ($1^{\circ}\text{C}/\text{min}$) ergaben folgendes (vgl. Abb.3) :

Bei den arktisch-borealen Arten *Mytilus edulis* und *Macoma balthica* nimmt die Cilienaktivität an den isolierten Kiemenstücken bei Erniedrigung der Temperatur bis auf 0°C nur relativ wenig ab und wird auch bei weiterem Absinken der Temperatur bis zum Einsetzen der Eisbildung im Außenmedium aufrechterhalten. Diese Muscheln, die auch in der Gezeitenregion vorkommen, gehören in der Nordsee zu den wenigen Lamellibranchierarten, die dort im Sublitoral den

langen europäischen Eiswinter 1962/63 mit geringen oder keinen Schäden überstanden haben.

Weitere in der borealen Region vorkommende Arten, deren Kiemengewebe sich als relativ kälteunempfindlich erweisen, sind die Austern *Ostrea edulis* und *Crassostrea virginica*. Bei ihnen wird die Aktivität der Kiemencilien bei Abkühlung ebenfalls bis zum Eintritt der Eisbildung aufrechterhalten. Im Vergleich dazu ist das Kiemengewebe der Trogmuschel *Spisula solida* wesentlich empfindlicher gegenüber Kälteeinwirkung. Die Aktivität der Kiemencilien nimmt bei Temperaturerniedrigung unter $+5^{\circ}\text{C}$ stark ab. Ganz deutlich kommt bei -4°C der Cilienschlag vor dem Einsetzen der Eisbildung absolut zum Stillstand. Kälteexposition bei -5°C überlebt das isolierte Kiemengewebe nur 20-30 min (Tab.5). In Übereinstimmung mit diesen Laboratoriumsbefunden erlitt dann auch diese Art, die im groben Sand in der sublitoralen Region der Nordsee in etwa 15-50 m Tiefe vorkommt, in dem oben erwähnten Winter erhebliche Schäden (ZIEGELMEIER, 1964).

Ähnlich wie bei *Spisula* fällt im Abkühlungsexperiment die Reaktion des Kiemengewebes von *Abra alba* aus, welche die küstenfernen Weichböden der Westlichen Ostsee in manchen Jahren mit einer Populationsdichte bis zu 6000 Exemplaren pro Quadratmeter besiedelten. Hiervon überlebten weniger als 1% den obengenannten Winter (KÜHLMORGEN-HILLE, 1963). Im Experiment ertragen isolierte Kiemenstücke Abkühlung auf -3°C 600-800 min (Tab.5).

Zum Vergleich mit den borealen Lamellibranchiern wurden auch solche mit subtropisch-tropischem Verbreitungsgebiet nach derselben Methode untersucht. Bei diesen Arten (*Isognomon alatus*, *Chama macrophylla*, *Chione cancellata*, *Chama cornucopia*, *Asaphis deflorata*) wird die Cilienaktivität schon bei Unterschreiten von Temperaturen um $+12^{\circ}$ bis $+8^{\circ}\text{C}$ stark herabgesetzt, und sie kommt bei mehreren von ihnen bereits bei 0 bis $+2^{\circ}\text{C}$ zum Stillstand.

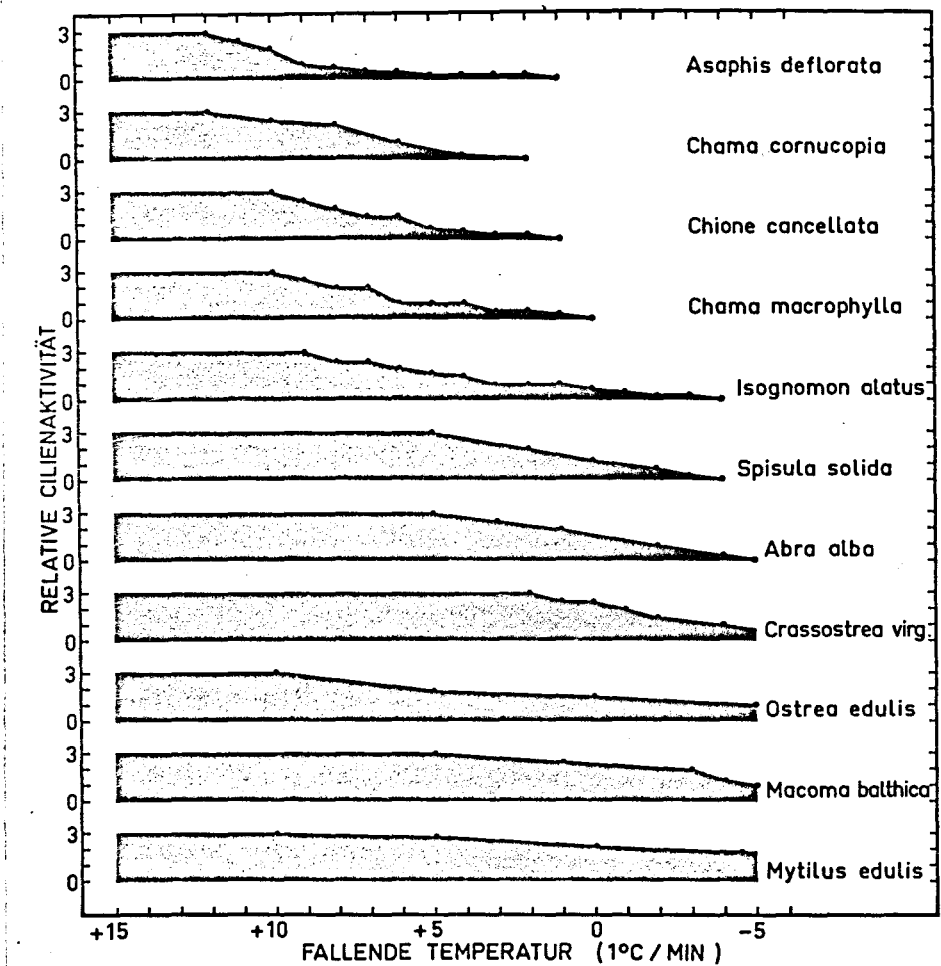


Abb. 3 : Reaktion der Kiemencilien verschiedener Muschelarten während gleichmäßiger Abkühlung (1°C/Minute). (Die Abkühlung ging von der Temperatur aus, bei der die Tiere vorher (2 Wochen) gehalten worden waren. Bei den Arten aus Florida war die AT 23,5°C, bei denen aus den europäischen Küstengewässern 15°C. Angaben für *Chama cornucopia* aus dem Roten Meer nach SCHLIEPER, FLÜGEL & THEEDE, 1967).

Ein Beispiel für besondere Kälteempfindlichkeit liefert *Chama cornucopia*, welche SCHLIEPER et al. (1967) in der oberen Gezeitenregion der Farasan-Inseln im südlichen Roten Meer fanden, wo sie auf felsigem Untergrund sessil lebt. Gewebe einer verwandten Art von der Südküste Floridas, *Chama macrophylla*, die dort im flachen Wasser ebenfalls auf felsigem Untergrund gefunden wurde, reagiert ähnlich empfindlich auf Abkühlung. Absoluter Cilienstillstand tritt bei einer um 2°C tieferen Temperatur, bei 0°C ein. Bei *Isognomon alatus* allerdings, einer Art, deren Verbreitung auf das Karibische Meer und die Küsten Floridas beschränkt ist, setzt die Kältestarre erst bei -4°C , bei den Muscheln *Chione cancellata* und *Asaphis deflorata* dagegen schon bei $+1^{\circ}\text{C}$ ein, obwohl *Chione* die nördliche Verbreitungsgrenze erst an der Küste von Nordkarolina und *Asaphis* bei den Bermuda-Inseln findet. *Isognomon* dringt aber bis in die obere Gezeitenregion vor und lebt dort exponiert an den Stelzwurzeln der Mangrove oder auf anderem harten Substrat festgesponnen, während *Chione* und *Asaphis* sich im flachen Wasser in den Meeresboden eingraben. Wahrscheinlich stehen diese ökologischen Besonderheiten in Beziehung zu den beobachteten Unterschieden der Abkühlungsresistenz.

Für diese Annahme sprechen auch die Ergebnisse zur zellulären Abkühlungsresistenz bei konstanter letaler Kälte (-3°C), bei der selbst während der längeren Versuchsdauer keinerlei Eisbildung eintrat (Tab.5). Die Resistenzuntersuchungen ergeben dabei für Muscheln aus Florida Überlebenszeiten von wenigen Minuten für besonders kälteempfindliche, aus dem tieferen Wasser stammende Arten (*Aequipecten gibbus nucleus*, *Laevicardium laevigatum*), von 30-90 min für Arten aus dem flachen Wasser im Bereich der unteren und mittleren Gezeitenregion (*Chione cancellata*, *Asaphis deflorata*) und bis über 24 Stunden für Arten, die bis in den Bereich der Hochwasserlinie vordringen (*Brachidontes exustus*, *Crassostrea virginica*).

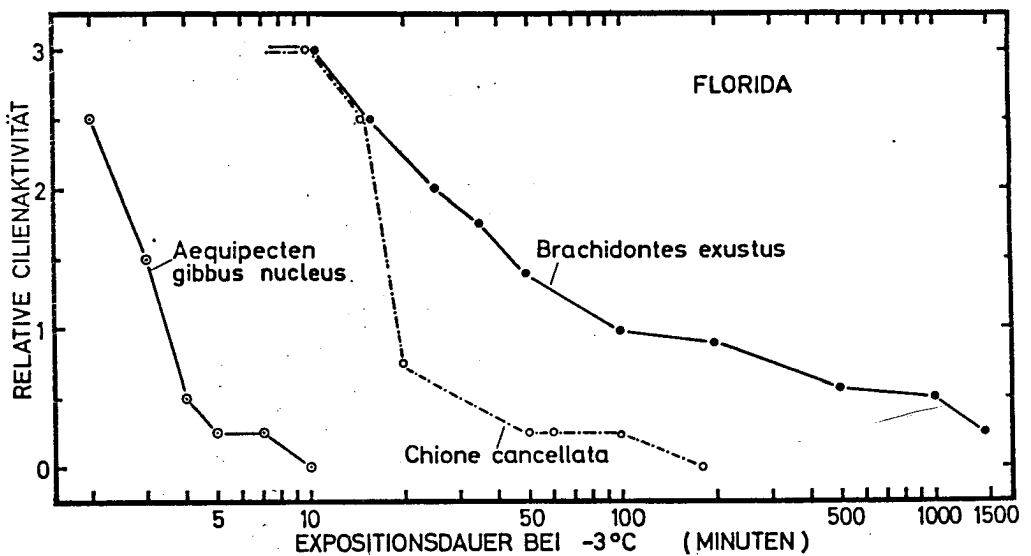
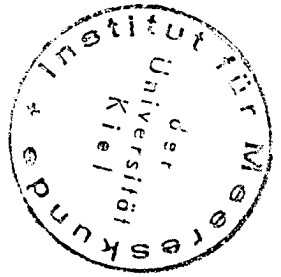


Abb. 4 : Artspezifische Unterschiede der zellulären Abkühlungsresistenz verschiedener Muschelarten aus Florida bei konstanter Temperatur. Die Reaktion des isolierten Kiemengewebes wurde nach unterschiedlich langer Expositionsdauer bei -3°C und anschließender Erholung (15 min) bei Zimmertemperatur ($23,5^{\circ}\text{C}$) geprüft. Hälterungstemperatur vor den Messungen : ($23,5^{\circ}\text{C}$)
Versuchszeit : November/Dezember 1967.

Auffallend bei der Untersuchung der Abkühlungsresistenz ist, daß das isolierte Kiemengewebe in der Kälte (bei -3°C) schon innerhalb relativ kurzer Zeit sehr geschädigt wird, in diesem Zustand noch lange überlebt und sich nach Rückführung in wärmeres Wasser nur unvollständig wieder erholt (Abb. 4).

3) Hitzeresistenz

Die hier wiedergegebenen vergleichenden Untersuchungen zur zellulären Hitzeresistenz wurden an Arten durchgeführt, bei denen auch die zelluläre Gefrier- oder Abkühlungsresistenz bestimmt worden war. Sie tragen so zu einer Charakterisierung des ganzen zellulären thermischen Resistenzbereichs dieser Lamellibranchier bei. In Abb. 5 wurden Werte zusammengestellt, die an Repräsentanten von geographisch weit voneinander entfernten Populationen jeweils einer Art ermittelt worden sind. Außerdem wird die zelluläre Resistenz einiger Arten einer Gattung (*Modiolus*) und in einem anderen Falle einer Familie (*Ostreidae*) miteinander verglichen.

Die untersuchten Lamellibranchier vom Kap Cod kommen dort alle in der Gezeitenregion vor. Die zelluläre Hitzeresistenz ist bei den einzelnen Arten umso größer, je weiter sich ihr Verbreitungsgebiet an der nordamerikanischen Atlantikküste nach Süden erstreckt. Am resistente-
sten ist das Gewebe der bis Südflorida und den Westindischen Inseln vordringenden Amerikanischen Auster, *Crassostrea virginica*. Die Hitzestarre der Kiemencilien bei gleichmäßiger Temperaturerhöhung ($1^{\circ}\text{C}/5\text{ min}$) tritt bei 47°C auf. Sie liegt in einem Temperaturbereich, in dem auch das Hitzekoma bei Gewebe ausschließlich tropisch-subtropischer litoraler Muschelarten beobachtet wird. Das gilt sowohl für Repräsentanten der Auster vom Kap Cod als auch für solche aus Florida. Bei den Vertretern beider Populationen fällt aber auf, daß das Gewebe während einer Erwärmung bereits weit unterhalb der Temperatur, die zum Eintritt der Hitzestarre führt, nur in einem Zustand

stark verringerter Aktivität überlebt, während es bei anderen litoralen Arten aus Südflorida Erwärmung bis wenige Grade unterhalb der Hitzestarre noch bei voller Aktivität erträgt. Isoliertes Gewebe von Austern aus Miami weist eine solche Aktivitätsverringerung bereits bei Temperaturerhöhung oberhalb von 34°C auf. Diese Reaktion des Kiemengewebes bringt bereits zum Ausdruck, daß *Crassostrea virginica* nicht optimal an subtropische Wärme angepaßt ist.

Die boreal-mediterrane Europäische Auster, *Ostrea edulis*, ist im Vergleich zur Amerikanischen Auster gegenüber Hitze und Kälte wesentlich weniger resistent (Hitzestarre bei 42°C ; zur Gefrierresistenz vgl. Tab. 3). In Übereinstimmung damit lebt diese Art im Litoral weniger exponiert als die Amerikanische Auster, sondern kommt vorzugsweise unterhalb der Gezeitenregion vor, wo sie nicht trockenfällt. Außerdem erstreckt sich ihr Verbreitungsgebiet, das von der europäischen Küste Mittelnorwegens bis zum Mittelmeer reicht, nicht so weit nach Süden.

Modiolus demissus von der nordamerikanischen Atlantikküste ist etwas weniger hitzeresistent als *Crassostrea virginica*. Die Hitzestarre des Kiemenepithels dieser Muschel tritt bei 46°C ein. Eine etwas hitzeempfindlichere Art aus derselben Gattung ist *Modiolus auriculatus* aus dem Roten Meer, die dort im flachen Wasser im oberen Felslitoral der Farasan-Inseln gefunden wurde. Beim Gewebe dieser Muschel kann man ähnlich wie bei den Kiemen der Amerikanischen Auster bei Temperaturerhöhung eine frühzeitig eintretende starke Aktivitätsverminderung feststellen (SCHLIEPER et al., 1967), was wohl darauf hindeutet, daß das eigentliche Hauptverbreitungsgebiet in einem Bereich mit gemäßigten und nicht mit subtropisch-tropischen Bedingungen liegt, wie sie am Fundort herrschten.

Ganz deutlich unterscheidet sich von diesen Arten die boreal zirkumpolare Muschel *Modiolus modiolus* durch ihre auffallend geringe zelluläre Hitzeresistenz (Hitzestarre bei 36°C). In der Nordsee und im Kattegat

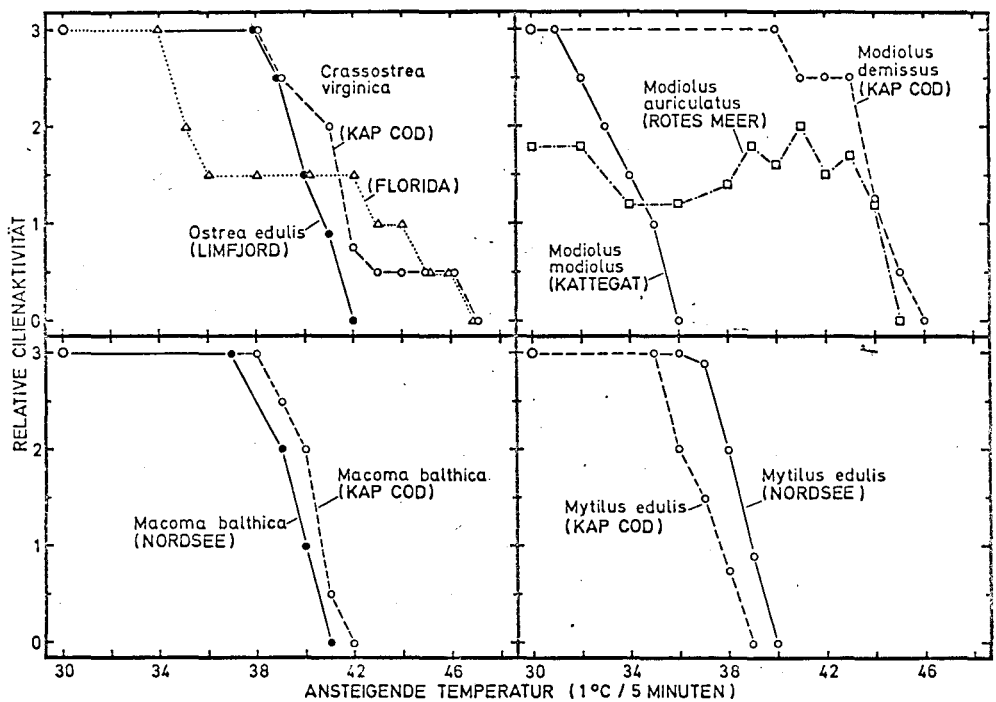


Abb. 5 : Reaktion des isolierten Kiemengewebes von Muscheln verschiedener Populationen derselben oder nahe verwandter Arten bei gleichmäßiger Temperaturerhöhung (1°C/5min). AT vgl. Abb. 6. (Vergleichswerte für *Ostrea edulis* und *Modiolus auriculatus* nach SCHLIEPER, FLÜGEL & TREDE, 1967).

bevorzugt sie das kühlere Tiefenwasser, das im Laufe des Jahres wesentlich geringere Temperaturschwankungen als das Oberflächenwasser aufweist.

Die an der amerikanischen Atlantikküste bis Georgia nach Süden vordringende *Macoma balthica* (Hitzestarre der Kiemencilien bei 42°C) ist etwas hitzeresistenter als die Miesmuschel *Mytilus edulis*, deren südliche Vorkommensgrenze etwa bei Kap Hatteras liegt. Durch Larventransport aus den Gewässern nördlich des Kaps siedeln sich Jungtiere von *Mytilus* bis Südkarolina an. Sie können sich aber nur in den kühleren Monaten des Jahres dort halten und sterben wieder ab, sobald durch das warme Wasser des Golfstromes die Temperatur von annähernd 29°C erreicht wird (WELLS & GRAY, 1960). Bei *Macoma balthica* stimmt die Hitzeresistenz des isolierten Kiemengewebes der Repräsentanten vom Kap Cod und der aus der Nordsee nicht ganz überein. Der Eintritt des Hitzekomas bei Nordsee-Tieren (41°C) und bei Tieren vom Kap Cod (42°C) differiert um 1°C .

Auch bei den entsprechenden Populationen von *Mytilus edulis* unterscheidet sich die Hitzeresistenz des Kiemengewebes um praktisch den gleichen Betrag, nur sind in diesem Fall die Gewebe der Nordseeindividuen die resistenteren. Wie aber aus Untersuchungen von DREGOLSKAYA (1963) und FRIEDRICH (1967) an *Mytilus* hervorgeht, muß man mit dem Auftreten erheblicher jahreszeitlicher Schwankungen der zellulären Hitzeresistenz rechnen, die mit dem Reproduktionszyklus und der Temperaturvorgeschichte der Versuchstiere zusammenhängen. Die Resistenzänderungen erfolgen dabei zum Teil relativ plötzlich. Nach eigenen Beobachtungen kann sich bei Miesmuscheln aus der Kieler Förde auch nach 3wöchiger gleicher Vorbehandlung (AT 15°C) zu verschiedenen Jahreszeiten der Eintritt des Hitzekomas um $1,5^{\circ}\text{C}$ (zwischen 38° und $39,5^{\circ}\text{C}$) verschieben. Obwohl nun die angegebenen Werte für Tiere aus der Nordsee und vom Kap Cod nach der gleichen Methode und zur gleichen Jahreszeit ermittelt wurden, ist nicht auszuschließen, daß die gefundenen geringen Unterschiede in unterschiedlicher Vorgeschichte beider Populationen begründet liegen.

Geringfügige Phasendifferenzen zwischen den Resistenz-Jahreskurven beider Populationen könnten schon die Ursache dafür sein. -

Im folgenden werden die Ergebnisse vergleichender Untersuchungen über die zelluläre Hitzeresistenz einiger Muschelarten aus dem Süden Floridas wiedergegeben (Abb.6). Eine Reihe dieser Arten weist annähernd dieselbe Nord-Süd-Verbreitung auf, die sich von Nordkarolina bis zu den Westindischen Inseln erstreckt. Es handelt sich um *Brachidontes exustus*, *Chama macrophylla*, *Chione cancellata* und *Laevicardium laevigatum*. Der Vorkommensbereich von *Asaphis deflorata* reicht vom Karibischen Meer bis Südost-Florida und den Bermuda-Inseln. *Brachidontes*, in der oberen Gezeitenregion an Felsen und Steinen mit Byssusfäden festgesponnen, *Asaphis* aus dem Flachwasser und Sandwatt, sind von ihnen am hitzeresistentesten. Sie sind jedoch nur wenig resistenter als *Crassostrea*. Muscheln, die nicht so stark exponiert vorkommen (*Chama macrophylla*, *Chione cancellata*), haben eine geringere Hitzeresistenz. Noch etwas empfindlicher verhält sich *Laevicardium laevigatum*, die im flachen Wasser auf Weichböden auch etwas geschützter lebt.

Zwei Arten wurden untersucht, die nur in der Karibischen See vom Süden Floridas bis zu den Westindischen Inseln vorkommen. Ihr Verbreitungsgebiet ist demnach wesentlich enger als das der zuvor genannten Arten. Von ihnen ist *Isognomon alatus* besonders hitzeresistent, vergleichbar mit *Brachidontes* und *Asaphis*. Diese Muschel kommt in ihrem Verbreitungsgebiet häufig im oberen Litoral auf verschiedenem festen Substrat und an Wurzeln der Mangrove exponiert vor. Als besonders hitze- und kälteempfindlich erwies sich dagegen *Aequipecten gibbus nucleus* die an den Küsten Floridas auf tiefere Wasserschichten unterhalb der Niedrigwasserlinie beschränkt ist.

Von den untersuchten europäischen Formen haben die beiden lusitanisch borealen Arten, *Ostrea edulis* und *Cardium edule*, die hitzeresistentesten Kiemengewebe. Die zelluläre Resistenz der übrigen eulitoralischen Arten

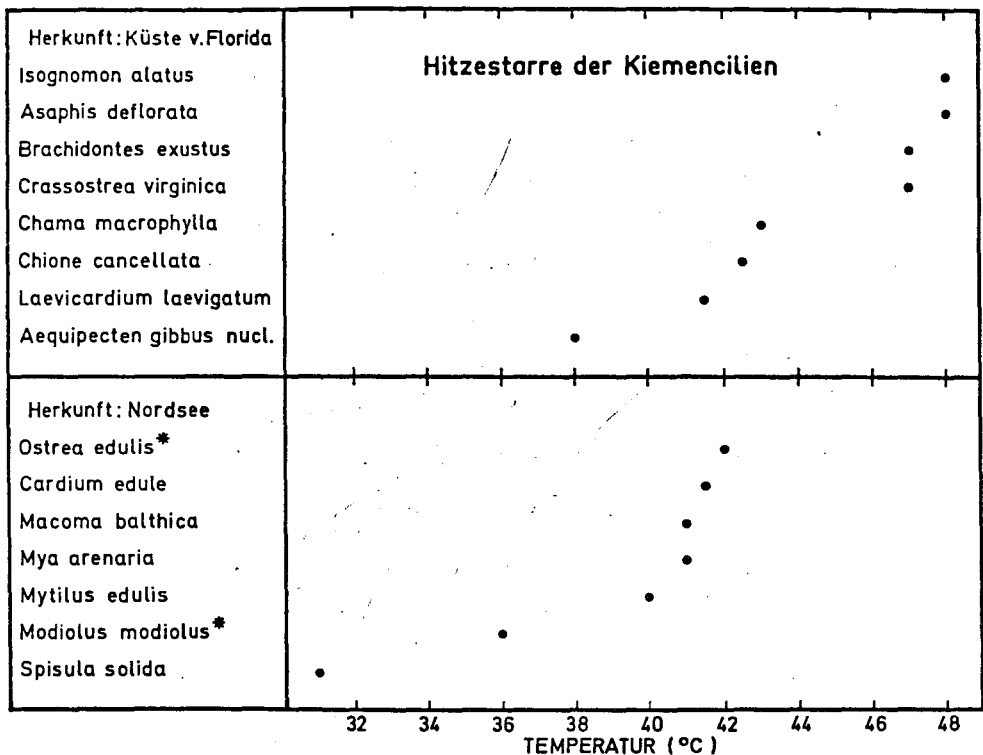


Abb. 6 : Eintritt der Hitzestarre der terminalen Randcilien an isolierten Kiemenstücken verschiedener Muschelarten bei gleichmäßiger Temperaturerhöhung (1°C/5 min). (Die Erwärmung ging bei den Arten aus Florida von 25°C aus, bei denen aus den europäischen Küstengewässern von 20°C. Vor den Versuchen wurden die Tiere 1-3 Wochen in Aquarien gehalten, in Miami bei 32,3°/ooS und 23,5°C, in Kiel bei 30°/ooS, *Modiolus* und *Spisula* bei 10°C, die übrigen Arten bei 15°C. Werte für *Ostrea*, *Mytilus* und *Spisula* nach SCHLIEPER, FLÜGEL & THEEDE, 1967)
 * Fundort von *Ostrea* : Limfjord,
 von *Modiolus* : Kattegat.

(Macoma, Mya, Mytilus) ist nur wenig geringer. Die geringste Resistenz weisen Arten aus den tieferen sublitoralen Wasserschichten auf. Kleine Abweichungen der von RESHÖFT (1961) für die zelluläre Resistenz von Mytilus, Modiolus und Spisula gefundenen Werte sind wahrscheinlich auf die unterschiedliche Vorbehandlung der Tiere und auf eine etwas andere Versuchsdurchführung - Temperaturanstieg bei RESHÖFT $1^{\circ}\text{C}/15 \text{ min}$ - zurückzuführen.

Insgesamt zeigt die zelluläre Hitzeresistenz bei den untersuchten Lamellibranchiern deutliche Beziehungen zum Temperaturbereich des jeweiligen Vorkommensbereiches der Arten.

II. Einflüsse verschiedener Faktoren auf die thermische Resistenz, insbesondere die Gefrierresistenz

1) Jahreszeit

Hitze- und Kälteresistenz mariner Evertebraten können starke jahreszeitliche Schwankungen aufweisen. VOGEL (1966) beobachtete das bei dem Ciliaten *Zoothamnium hiketes*. DREGOLSKAYA (1963) wies jahreszeitlich bedingte Unterschiede der zellulären Hitzeresistenz bei *Mytilus galloprovincialis* aus dem Schwarzen Meer und L. FRIEDRICH (1967) solche bei *Mytilus edulis* aus der Nord- und Ostsee nach. Beide Autoren bringen diese insbesondere mit der Gonadenentwicklung der Tiere in Zusammenhang. Zunehmende Gonadenentwicklung hat nach L. FRIEDRICH Abnahme der zellulären Hitzeresistenz zur Folge, welche einige Zeit nach dem Abbläichen der Muscheln wieder ansteigt. Nach L. FRIEDRICH kommen bei *Mytilus edulis* aus der Ostsee im Laufe eines Jahres 2 Resistenzmaxima vor; das eine fällt in den Winter, das andere in den Sommer. Die Minima fallen ins Frühjahr und in den Herbst. Von demselben Autor konnten auch vorübergehende, durch die Temperaturvorbehandlung der ganzen Tiere und Gewebe bedingte Änderungen der zellulären Hitzeresistenz nachgewiesen werden.

Nach KANWISHER (1955) ist die hohe winterliche Gefrierresistenz mariner Mollusken aus der Gezeitenregion im Sommer stark reduziert. Das gilt auch für die Resistenz des isolierten Kiemengewebes verschiedener Muschelarten wie *Mytilus edulis*, *Cardium edule*, *Macoma balthica* (THEEDE 1965). An der norwegischen Küste fand SÖMME (1966) ähnliche jahreszeitliche Schwankungen der Gefrierresistenz bei *Balanus balanoides*, *Littorina rudis* und *Littorina littorea*. Die mittlere letale Temperatur (50 % Mortalität nach 18 h Expositionsdauer) beträgt bei *Balanus balanoides* im Sommer (Mai-Oktober) -6°C bis -8°C und im Winter (Dezember-Februar) -14°C bis -18°C (CRISP & RITZ, 1967). Im Herbst, während der Phase schneller Zunahme der Gefrierresistenz, bilden die höher im Litoral exponierten Tiere diese Eigenschaft stärker aus als Individuen derselben Art von tiefer gelegenen Standorten.

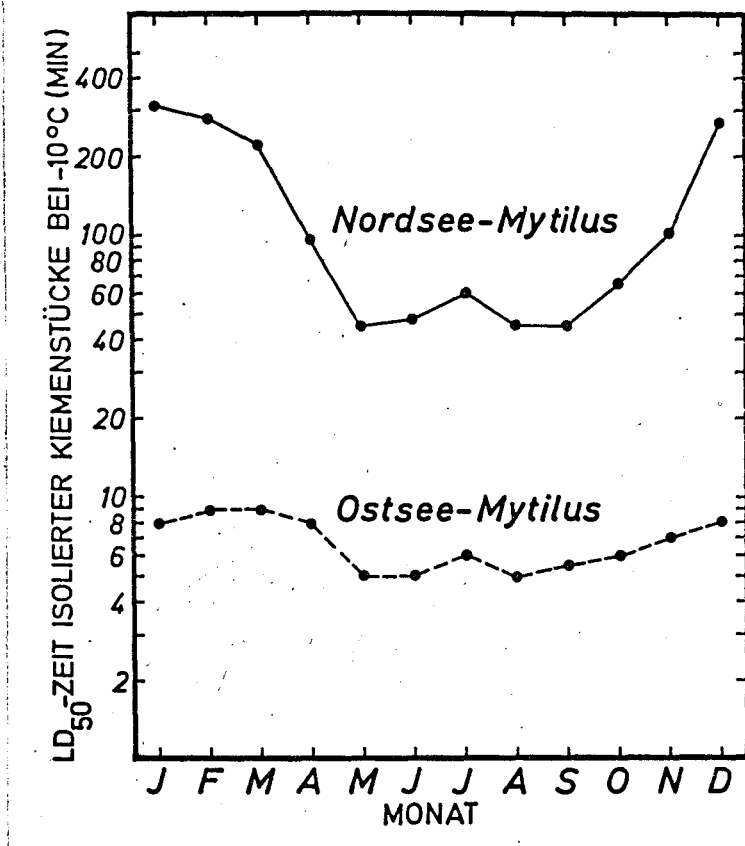


Abb. 7 : Der jahreszeitliche Verlauf der zellulären Gefrierresistenz bei *Mytilus edulis* aus der Nordsee (Watt bei Büsum) und aus der Ostsee (Kieler Förde). Nach unterschiedlich langem Einfrieren isolierter Kiemenstücke bei -10°C , anschließendem Auftauen und 10 min Erholungs-dauer bei Zimmertemperatur von etwa 20°C wurde die Anzahl der überlebenden Gewebestücke festgestellt. Als Überlebenskriterium diente dabei die Cilienaktivität. Aus den erhaltenen Werten wurde die Expositionszeit bei -10°C ermittelt, bei der noch 50% der Gewebestücke überlebten (LD_{50} -Zeit). Gewebe von Individuen aus der Nordsee wurde in Meerwasser von $30^{\circ}/\text{oos}$, von Tieren aus der Ostsee in solchem von $15^{\circ}/\text{oos}$ untersucht.
Beobachtungszeitraum 1968.

Im Anschluß an frühere Untersuchungen (THEEDE 1965) wurde der jahreszeitliche Verlauf der zellulären Gefrierresistenz von Miesmuscheln aus der Nordsee ($\sim 30^{\circ}/\infty$ S) und aus der Ostsee ($\sim 15^{\circ}/\infty$ S) genauer untersucht. Dabei ergab sich ein sehr unterschiedliches Verhalten der Tiere an beiden Standorten (Abb. 7).

Exemplare aus dem Wattenmeer der Nordsee weisen ein deutliches Resistenzmaximum im Winter auf (von Dezember-März), welches schon im Spätherbst, insbesondere im November, aufgebaut wird. Gegen Ende des Winters (Februar/März) hatten einzelne Tiergruppen eine wesentlich geringere zelluläre Gefrierresistenz als ihre Artgenossen von anderen Fundstellen. Möglicherweise sind solche Exemplare durch vorübergehendes Einfrieren in der Natur schon etwas geschädigt. - Im April nimmt die Resistenz deutlich ab. Von Mai bis Oktober ist die Gefrierresistenz stark reduziert und zeigt während dieser Monate nur geringe Schwankungen. Die Überlebenszeiten der Gewebestücke betragen nur ungefähr $1/4$ bis $1/6$ der Winterwerte.

Ein Vergleich mit den von FRIEDRICH ermittelten Werten für die zelluläre Hitzeresistenz von Nordsee-Individuen der Miesmuschel ist nur bedingt möglich, da FRIEDRICH seine Nordsee-Tiere vor der Untersuchung jeweils 10 Tage an eine Temperatur von 10°C angepaßt hat, während der Autor die zelluläre Gefrierresistenz baldmöglichst nach dem Fang der Muscheln bestimmte. FRIEDRICH fand für die zelluläre Hitzeresistenz ein ausgeprägtes Maximum im Frühjahr und eins im Herbst, während bei der zellulären Gefrierresistenz nur eins im Winter lag. Bei Miesmuscheln aus der Ostsee (Kieler Förde) sind die Winterwerte für die zelluläre Gefrierresistenz nur wenig höher als die Sommerwerte.

Insgesamt deutet die sehr unterschiedliche Abhängigkeit der zellulären Hitze- und Gefrierresistenz von der Jahreszeit darauf hin, daß diesen Resistenzen und ihren Veränderungen verschiedene Mechanismen zugrunde liegen. In die gleiche Richtung weisen auch die von anderen

Autoren VOGEL (1966), PRECHT et al. (1966), BASEDOW (1968) u.a. bei Temperatur-Umadaptationsversuchen beobachteten Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Änderungen von Hitze- und Kälteresistenz (Abkühlungs- und Gefrierresistenz).

2) Anpassungstemperatur innerhalb des ökologischen Temperaturbereiches

Die Mechanismen, die bei litoralen marinen Evertebraten zur Erhöhung ihrer G e f r i e r r e s i s t e n z im Winter führen, sind noch nicht völlig geklärt. CRISP and RITZ (1967) gingen diesem Problem an Balaniden nach und hielten Sommerexemplare von *Balanus balanoides* über 5 Monate bei der niedrigen Temperatur von $3-4^{\circ}\text{C}$ unter Laboratoriumsbedingungen. Im Vergleich zu Sommertieren und Individuen, die bei $15-17^{\circ}\text{C}$ gehalten wurden, hatte sich ihre Gefrierresistenz dadurch nur geringfügig erhöht. Es zeigte sich, daß die Seepocken ihre hohe winterliche Gefrierresistenz nur am natürlichen Standort erreichten. Nach CRISP & RITZ trifft diese mit einer Periode physiologischen Winterschlafs ("physiological hibernation") zusammen, die mit verminderter Nahrungsaufnahme und reduzierter Stoffwechseltätigkeit verbunden ist. -

Verschiedene wirbellose Tiere weisen eine ausgeprägte sinnvolle Gefrierresistenzadaptation auf, z.B. das Ciliat *Zoothamnium hiketes* (VOGEL 1966), Larven des Schmetterlings *Ephestia kühniella* (SÖMME 1968) und der Oligochaet *Enchytraeus albidus* (KÄHLER 1970).

Bei einzelnen marinen Muschelarten aus dem Eulitoral konnten beträchtliche Auswirkungen einer sinnvollen Gefrierresistenzadaptation auch auf zellulärer Ebene nachgewiesen werden (Abb. 8-10). Bei Miesmuscheln aus der Nordsee (im September 1966 gefangen) wies das isolierte Kiemengewebe eine relativ geringe Gefrierresistenz auf, welche nur wenig von den für Sommertiere charakteristischen Werten abwich (Abb.8). Ein Teil dieser Versuchstiere wurde unter Laboratoriumsbedingungen im Wasser mit

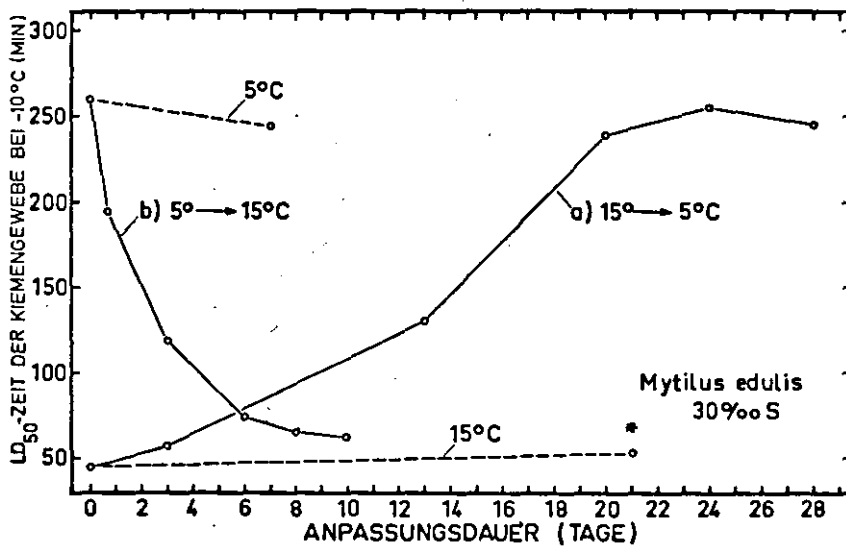


Abb. 8 : *Mytilus edulis* aus der Nordsee (Büsum, Salzgehalt 30‰). Der zeitliche Verlauf der Gefrierresistenzadaptation bei Wechsel der Anpassungstemperaturen 5°C und 15°C. (Nach Einfrieren des isolierten Kiemengewebes bei -10°C, anschließendem Auftauen und jeweils 10 min Erholungsdauer bei Zimmertemperatur von 20°C wurde die Anzahl der überlebenden Gewebestücke festgestellt. Als Überlebenskriterium diente die Cilienaktivität). * Wert f. Tiere a. d. freien Natur
Versuchszeit : a) September 1966,
b) November 1969.

Fundortsalzgehalt (30°/ooS) bei 15° C gehalten. Dabei änderte sich deren Gefrierresistenz innerhalb eines Zeitraumes von 4 Wochen praktisch nicht. Im Vergleich zu diesen und zu den Artgenossen in der freien Natur wurde das Kiemengewebe der bei 5°C gehaltenen Exemplare gegenüber den Wirkungen des Gefrierens und Auftauens innerhalb von 3 Wochen wesentlich resistenter. In dieser Zeit war der Adaptationsvorgang annähernd abgeschlossen. Am natürlichen Standort im Wattenmeer bei Büsum erhöhte sich in demselben Zeitraum die Gefrierresistenz der Miesmuscheln aber nur geringfügig. In einer weiteren Versuchsserie (Abb.8) wurden vorher 3 Wochen an 5°C angepaßte Nordsee-Miesmuscheln in Wasser von 15°C überführt. Schon an den folgenden Tagen sank die zelluläre Gefrierresistenz stark ab und hatte nach etwa 6 Tagen annähernd das Niveau erreicht, auf dem sie sich dann eine gewisse Zeit hielt. Hieraus geht hervor, daß die bei Temperaturerhöhung eintretende Resistenzabnahme wesentlich schneller erfolgt als die Resistenzsteigerung bei Abkühlung.

Die in Abb. 9 wiedergegebenen Ergebnisse lassen die Auswirkungen der Temperaturvorbehandlung auf die zelluläre Gefrierresistenz bei unterschiedlich starker Abkühlung erkennen. In dem ganzen untersuchten Temperaturbereich von -5° bis -30°C sind die Gewebestücke der kaltangepaßten Tiere resistenter als die der warmangepaßten. Bei höherer Kühlbadtemperatur (-5°C) ist die Differenz der Überlebenszeiten von Gewebestücken beider Tiergruppen etwas größer als bei -30°C.

Weitere Anpassungsexperimente wurden mit 4 Muschelarten vom Kap Cod (*Mytilus edulis*, *Crassostrea virginica*, *Macoma balthica*, *Modiolus demissus*) durchgeführt (vgl. Abb. 10). Von jeder Art wurde jeweils eine Tiergruppe bei 5°C, die andere bei 23,5°C gehalten. Nach 14 Tagen ließen die Bestimmungen der zellulären Gefrierresistenz bei allen Tieren eine deutliche Beeinflussung der Resistenz durch die unterschiedliche thermische Vorbehandlung erkennen. Der Effekt der Gefrierresistenzadaptation war bei der am stärksten im Eulitoral exponierten und in

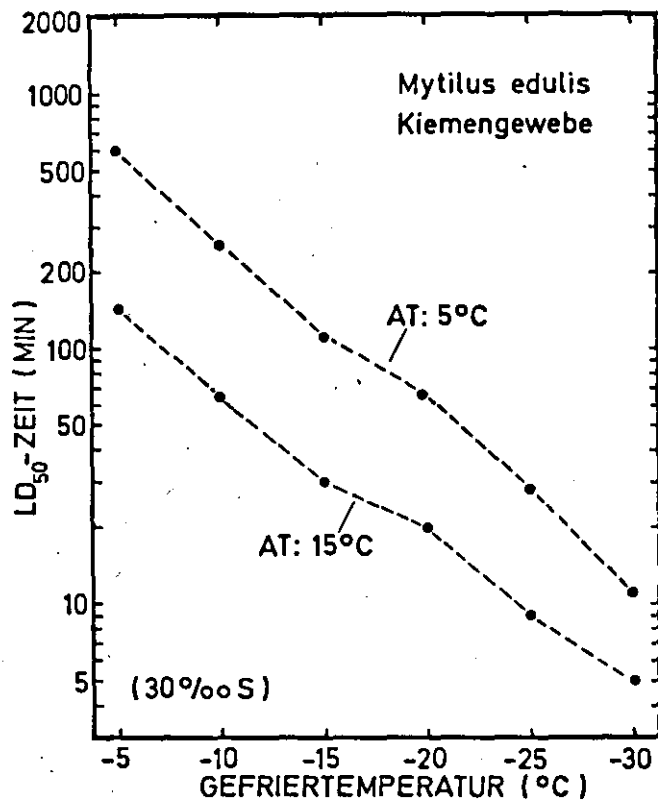


Abb. 9 : *Mytilus edulis* aus der Nordsee.
Der Einfluß nichtgenetischer Temperaturadaptation der ganzen Tiere auf die Gefrierresistenz des isolierten Kiemengewebes bei unterschiedlichen Gefriertemperaturen. Die Dauer der Anpassung an die Temperaturen 5°C und 15°C betrug 20 Tage.
Salzgehalt während der Anpassung und der Versuche : 30‰. Versuchszeit : Juli/August 1970.

dieser Zone am weitesten nach Norden vordringenden Miesmuschel am größten. Diese Art zeigte von den untersuchten nach Kaltanpassung (5°C) die höchste, nach Warmanpassung ($23,5^{\circ}\text{C}$) die geringste Gefrierresistenz. Allerdings war nach dieser 14tägigen Vorbehandlungsdauer der Adaptationsvorgang noch nicht ganz abgeschlossen. Bei Nordseetieren (*Mytilus edulis*) stieg die zelluläre Gefrierresistenz im Laufe längerer Anpassung an 5°C (vgl. Abb. 8) noch etwas weiter an. Bei den übrigen der obengenannten Lamellibranchierarten ist der Effekt der "sinnvollen" Gefrierresistenzadaptation geringer.

Der nachgewiesene Einfluß der thermischen nichtgenetischen Adaptation auf die zelluläre Gefrierresistenz dürfte bei den genannten Arten auch für die ähnlich großen jahreszeitlichen Unterschiede dieser Resistenz verantwortlich sein. Hingewiesen sei auf Zusammenhänge zwischen dem Ausmaß der Gefrierresistenzsteigerung der Arten durch nichtgenetische Temperaturadaptation und der Ausdehnung ihres Vorkommensbereiches in nord-südlicher Richtung sowie ihrer winterlichen Exposition im Litoral. So ist, wie aus Abb. 10 und Tab. 4 hervorgeht, die Fähigkeit zur Steigerung der Gefrierresistenz in der Kälte bei den in der temperierten Zone im Eulitoral exponiert lebenden Arten *Crassostrea virginica* und *Modiolus demissus* größer als bei der ähnlich stark exponierten, vorwiegend subtropischen *Brachidontes exustus*. Unter den Lamellibranchiern, deren Verbreitungsgebiet bis in arktische Gewässer reicht, ist der Effekt der Gefrierresistenzadaptation bei der Miesmuschel *Mytilus edulis*, die auch im Winter an der nördlichen Grenze der borealen Region in der Gezeitenregion angetroffen werden kann, größer als bei *Macoma balthica*, die dort im Winter von Wasser bedeckt bleibt.

Bei der Resistenzadaptation an extrem niedrige Temperaturen läßt sich zwischen einer Adaptation der Gefrierresistenz und einer solchen der A b k ü h - l u n g s r e s i s t e n z unterscheiden. Die

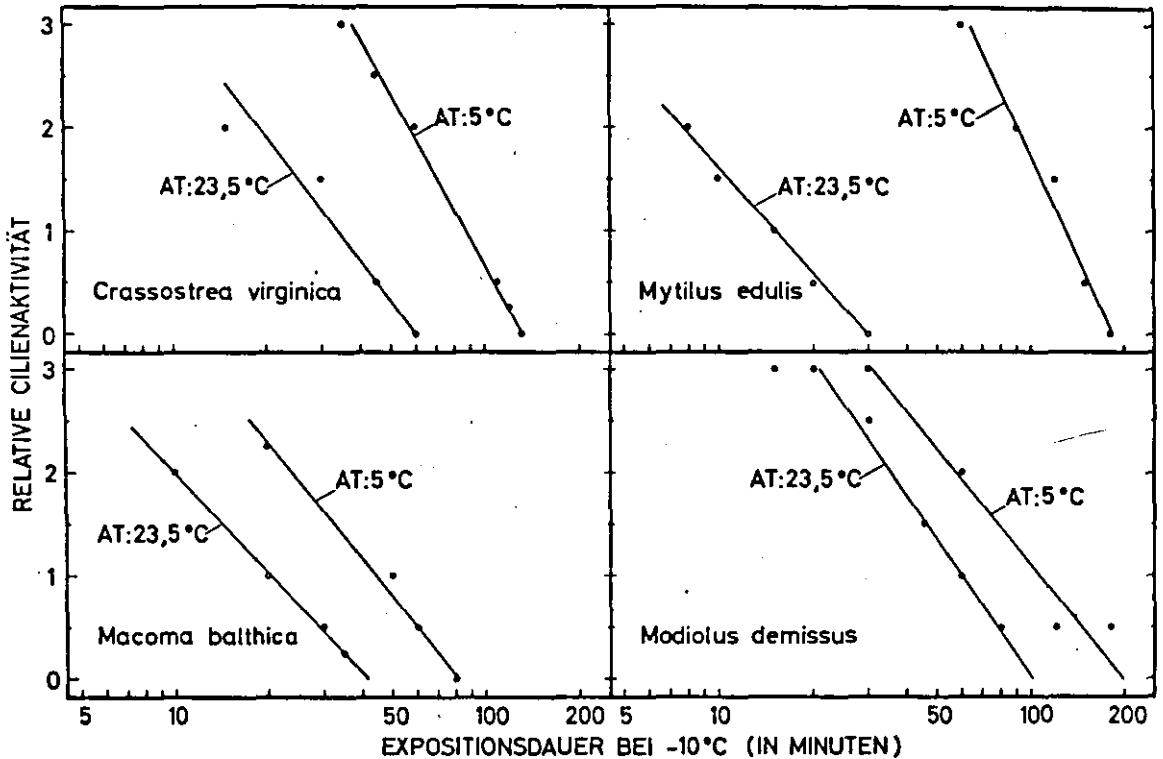


Abb. 10 : Einfluß der Adaptationstemperatur auf die zelluläre Gefrierresistenz verschiedener litoraler Muschelarten vom Kap Cod. Vor den Resistenzmessungen an isolierten Kiemenstücken wurden die Versuchstiere 14 Tage bei den Anpassungstemperaturen von 5° und 23,5°C gehalten. Salzgehalt : 32,3‰. Mittelwert aus jeweils 8 Einzelbeobachtungen. Versuchszeit : Dezember 1967.

Adaptation der Abkühlungsresistenz kann am besten an solchen Arten studiert werden, die schon bei Temperaturen oberhalb des Eintritts von Eisbildung, allein durch die Kälteeinwirkung absterben. Auch an Organen und Gewebefunktionen solcher Arten läßt sich diese Resistenzadaptation untersuchen. Nach PRECHT & CHRISTOPHERSEN (1965) weist z.B. das Cilienepithel der Fühlerspitzen der Posthornschnecke *Planorbis corneus* eine sinnvolle Kälteadaptation auf (vgl. auch PRECHT et al., 1966).

Bei marinen Muscheln wurde nun die Auswirkung unterschiedlicher Temperaturadaptation auf die Abkühlungsresistenz des Kiemengewebes untersucht (vgl. Tab. 6). Isolierte Kiemenstücke der vorwiegend subtropischen Art *Chione cancellata* überleben nach 14 Tagen Hälterung der Versuchstiere in Fundortwasser von $23,5^{\circ}\text{C}$ eine Kälteexposition im Meerwasser von -3°C etwa 1/2 bis 2 Stunden lang. Dabei ist das Gewebe der überlebenden Kiemenstücke schon nach 25-30 Minuten so stark geschädigt, daß es auch nach einer anschließenden 15minütigen Erholungsphase bei Zimmertemperatur ($23-24^{\circ}\text{C}$) nur noch ganz geringe Cilienaktivität besitzt. Nach vorheriger Anpassung der Tiere an 15°C ist das Ausmaß der Schädigung des Gewebes nach entsprechender Exposition bei -3°C deutlich geringer. Es überlebt 2 bis 6 Stunden. - Ein im Vergleich dazu wesentlich stärkerer Anpassungseffekt ergibt sich bei Kiemengewebe von Exemplaren, die vorher bei 10°C gehalten worden sind. Das Gewebe überlebt dann Kälte von -3°C über 6 Stunden, maximal 30 Stunden, in einem wesentlich besseren Zustand als in den vorigen Fällen. Dieses Ergebnis zeigt deutlich, daß bei *Chione cancellata* die Auswirkung der individuellen thermischen Adaptation auf die zelluläre Abkühlungsresistenz nach zwei Wochen Anpassungsdauer in dem unteren Temperaturintervall ($10^{\circ}\text{C}-15^{\circ}\text{C}$) wesentlich stärker als in dem nächsthöheren Intervall ($15^{\circ}\text{C}-23,5^{\circ}\text{C}$) ist.

Die Auswirkungen der individuellen Temperaturadaptation auf die H i t z e r e s i s t e n z wurden ebenfalls bei dem Kiemengewebe von *Chione*

Tabelle 6

Chione cancellata. Einfluß individueller Temperaturadaptation auf die zelluläre Abkühlungsresistenz. Nach 14tägiger Hälterung ganzer intakter Tiere bei verschiedenen Temperaturen wurde die zelluläre Abkühlungsresistenz des isolierten Kiemenepithels bei -3°C bestimmt.
Versuchszeit : November/Dezember 1967.

Anzahl überlebender Kiemenstücke von 10 Exemplaren nach folgender Expositionsdauer bei -3°C in Minuten											
AT	10	20	30	50	100	200	300	500	1000	1500	2000
23,5 $^{\circ}\text{C}$	10	10	7	4	3	0	0	0	0	0	0
15 $^{\circ}\text{C}$	10	10	10	10	6	4	1	0	0	0	0
10 $^{\circ}\text{C}$	10	10	10	10	10	10	10	8	6	5	1

Mittlere relative Cilienaktivität der überlebenden Kiemenstücke											
23,5 $^{\circ}\text{C}$	3	1	0,5	0,5	0,5	0					
15 $^{\circ}\text{C}$	3	1,5	1	1	0,5	0,5	0,5	0			
10 $^{\circ}\text{C}$	3	3	3	2	1,5	1,5	1	0,75	0,5	0,5	0,5

cancellata untersucht. Die Anpassungstemperaturen 10° , 15° und $23,5^{\circ}\text{C}$ waren die gleichen wie bei den Versuchen zur Abkühlungsresistenz. Die Resistenzmessungen wurden nach einer Anpassungsdauer von 8 und 14 Tagen durchgeführt (vgl. Tab. 7). Dabei wurden die Kiemenstücke von Individuen aus den drei Temperaturstufen bei jedem Versuch in der Untersuchungskammer zusammen untergebracht und bei gleichmäßiger Erwärmung fortlaufend beobachtet. Es ergab sich nach 8 Tagen Anpassungsdauer folgendes: Schon relativ frühzeitig, bei Erwärmung über 30°C , beginnt die Cilienaktivität bei Gewebestücken der an 10°C angepaßten Individuen deutlich abzunehmen. Von 35°C an überlebt das Gewebe nur noch unter Aufrechterhaltung einer minimalen Cilienaktivität (Aktivitätsstufe 1-0,5), bis diese bei $41,5^{\circ}\text{C}$ ganz eingestellt wird. Die Aktivität der Kiemencilien von Tieren, die an 15°C angepaßt waren, ist während der Temperaturerhöhung in dem Bereich von $30-38^{\circ}\text{C}$ zwar größer, die Hitzestarre setzt jedoch ebenfalls bei $41,5^{\circ}\text{C}$ ein. Dagegen ist die Cilienaktivität der Gewebestücke von Muscheln aus Wasser von $23,5^{\circ}\text{C}$ noch bis 38°C "normal" (nicht sichtbar reduziert), bei Temperaturerhöhung über $39-40^{\circ}\text{C}$ nimmt sie dann stark ab, und die Hitzestarre setzt bei $42,5^{\circ}\text{C}$ ein. Nach 8 Tagen tritt also schon ein deutlicher Anpassungseffekt bei Geweben von warm- und kaltangepaßten Tieren auf. Nach 14 Tagen Anpassungsdauer sind die Unterschiede der Hitzeresistenz des Kiemengewebes der drei Tiergruppen größer geworden. Die Hitzestarre tritt bei Gewebestücken der an 10° , 15° und $23,5^{\circ}$ angepaßten Individuen bei 39° , 40° und 42°C ein. *Chione cancellata* ist also eine Muschelart mit deutlich ausgeprägter sinnvoller Adaptation der Abkühlungs- und Hitzeresistenz, welche auch auf zellulärer Ebene nachweisbar ist.

Auch VERNBERG et al. (1963) fanden bei marinen Muscheln, daß isolierte Kiemenstücke warmadaptierter Exemplare von *Crassostrea virginica* und *Modiolus demissus* aus Nordkarolina (AT 25°C) bei konstanter letaler Temperatur deutlich länger überleben als von

Tabelle 7

Chione cancellata. Einfluß individueller Temperaturadaptation auf die zelluläre Hitzeresistenz. (Nach Hälterung ganzer intakter Tiere bei unterschiedlichen Temperaturen wurde der Eintritt der Hitzestarre der terminalen Randcilien isolierter Kiemenstücke bei gleichmäßiger Erwärmung ($1^{\circ}\text{C}/5\text{ min}$) ermittelt. Salzgehalt : $32,3^{\circ}/\text{oo}$. Mittelwerte aus Beobachtungen an Kiemenstückchen von je 8 Individuen in jeder Temperaturstufe. Die Beobachtungen wurden in Abständen von $0,5^{\circ}\text{C}$ angestellt. Die errechnete Standardabweichung ergibt in allen Fällen Werte bis zu $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Sie ist also mit maximal $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ anzugeben. Versuchszeit : November/Dezember 1967.

Angaben der Temperatur ($^{\circ}\text{C}$), bei der Hitzestarre der terminalen Kiemencilien eintritt		
AT	8 Tage Anpassungsdauer	14 Tage Anpassungsdauer
10 $^{\circ}\text{C}$	41,5 $^{\circ}$	39 $^{\circ}$
15 $^{\circ}\text{C}$	41,5 $^{\circ}$	40 $^{\circ}$
23,5 $^{\circ}\text{C}$	42,5 $^{\circ}$	42 $^{\circ}$

kaltangepaßten Tieren (AT 10°C). Dagegen wurde bei der sublitoralen *Aequipecten irradians* nach entsprechender Vorbehandlung keine Veränderung der zellulären Hitzeresistenz festgestellt. SCHLIEPER (1966) berichtet über zelluläre Hitzeresistenzadaptationen bei Tentakelstückchen der Seeanemone *Metridium senile*. LAGERSPETZ & DUBITSCHER (1966) wiesen bei der süßwasserlebenden *Anodonta cygnea* nach Hälterung bei verschiedenen Temperaturen Unterschiede der zellulären Hitzeresistenz nach. FRIEDRICH (1967) fand vorübergehende sinnvolle Änderungen der zellulären Hitzeresistenz nach Umadaptation ganzer Tiere oder isolierter Gewebestücke von *Mytilus edulis*.

3) Kurzfristige Einwirkung extremer subletaler Temperatur

Verschiedene Autoren konnten durch kurzfristige Vorbehandlung tierischer und pflanzlicher Gewebe mit hohen subletalen Temperaturen eine Steigerung der Resistenz gegenüber Hitze und einigen vorwiegend denaturierend wirkenden Faktoren und Substanzen erzielen. Dagegen war die Resistenz nicht erhöht gegenüber Chemikalien, deren Letalwirkung primär auf einer Hemmung wichtiger Stoffwechselprozesse durch Blockierung von Fermenten beruht. ALEXANDROV (1964 und 1967, in TROSHIN, 1967), LOMAGIN et al in TROSHIN (1967) und DENKO (1967) führten solche Versuche an botanischen Objekten aus. SCHLACHTER und CHERNOKOZHEVA (1967) erzielten eine Zunahme der Resistenz von Froschmuskulatur gegenüber Hitze, Äthanol und Chinin, wenn sie das Gewebe vorher bis zu 15 Minuten bei 34°C hielten. FRIEDRICH (1967) fand, daß kurze Hitze- und Kälteschocks von wenigen Minuten Dauer die Hitze- und Gefrierresistenz isolierter Kiemenstücke von *Mytilus edulis* vorübergehend steigerten. Dabei soll die Höhe der Schocktemperatur, die am wirksamsten eine Steigerung der Hitzeresistenz zur Folge hat, jahreszeitlichen Schwankungen unterworfen sein.

PRECHT et al. (1966) haben ausführlich die Frage diskutiert, ob solche bei der "Schockanpassung" an subletale hohe oder niedrige Temperaturen auftretende Resistenzänderungen als Folge eines "heat-hardening" oder "cold-hardening" zu verstehen seien und als Phänomene besonderer Art von den Hitze- und Kälteadaptationen abzutrennen seien oder nicht. Dabei wird auch an die Möglichkeit gedacht, daß Temperaturschocks als "stress" Gegenreaktionen des Körpers auslösen könnten, die vielleicht als "hardening" zu bezeichnen und von der Resistenzadaptation zu unterscheiden wären. Nach verschiedenen Autoren sollen durch das "hardening" Zellproteine stabilisiert und gegenüber verschiedenen Umweltfaktoren resistenter werden. IRLINA, in TROSHIN (1967), S. 250 : "A non-specific increase in resistance of "warm" ciliates at the suprathreshold concentration might be due to the fact that the adaptation to high temperature leads to changes in the proteins of the protoplasm which render them more resistant to denaturant influences." Außer an eine direkte Beeinflussung der Proteinstruktur wurde an die schützende Wirkung antidenaturierender Stoffe, außerdem an eine Beschleunigung der Proteinsynthese und der Reparationsvorgänge in der Zelle gedacht (vgl. FELDMAN et al. 1967). Die zahlreichen Befunde von PRECHT et al. (1966) und seinem Schüler BASEDOW (1968) an Fischen, Amphibien und Wirbellosen aus verschiedenen systematischen Gruppen nötigen nicht zu einer Abtrennung der sog. "Schockanpassungen" von den Resistenzadaptationen. BASEDOW (1968) : "... die Versuche machen aber deutlich, daß sich bei der ausschließlichen Anwendung von Temperaturresistenzmessungen eine Schockanpassung von der Resistenzadaptation nur schwer abgrenzen läßt."

In weiteren Versuchen sollten nun die "Schockanpassungen" bei marinen Muscheln weiter analysiert werden. Insbesondere sollte im Anschluß an die Untersuchungen der russischen Autoren und FRIEDRICH (1967) geprüft werden, ob sich eine Vorbehandlung isolierter Gewebestücke mit hohen Temperaturen außer auf die Hitzeresistenz auch auf die Resistenz gegenüber anderen abiotischen Faktoren auswirkt.

Um die Streuung der Einzelwerte möglichst gering zu halten, wurden bei den Hitzeschockversuchen immer zwei benachbarte Kiemenstückchen aus jeweils ein und derselben Muschel miteinander verglichen, wobei das eine Gewebestück einer Hitzeschockvorbehandlung unterzogen wurde, während das andere ungeschockte Stück zum Vergleich diente. Die Gewebestücke, die einem Hitzeschock unterworfen werden sollten, wurden in markierter Reihenfolge auf einem kleinen Untersuchungstischchen aufgespannt und dann in einem vorbereiteten Wasserbad für jeweils 10 min der hohen subletalen Temperatur ausgesetzt. Nach Ablauf dieser Zeit kamen sie zur Erholung für weitere 10 min in Meerwasser von 15°C und annäherndem Fundortsalzgehalt ($15^{\circ}/\text{oo}$). Währenddessen wurden die Kontrollstücke auf dem Untersuchungstischchen den "geschockten" Gewebestücken gegenüber in der Weise aufgespannt, daß die terminalen Kiemenränder einander zugekehrt waren und so die zusammengehörigen Gewebestücke aus jeweils einer Muschel direkt miteinander verglichen werden konnten. Am Ende der Erholungszeit wurde der Untersuchungstisch in die Versuchskammer gebracht und dann die Hitzeresistenz bei 36°C oder die Resistenz gegenüber anderen Faktoren bestimmt. Dabei wurden im einzelnen die Abnahme der Cilienaktivität und die Cilienschlagdauer der geschockten und ungeschockten Kiemenstücke aus jeweils derselben Muschel bei der letalen Bedingung miteinander verglichen und in jedem Einzelfall die prozentuale Änderung der Cilienschlagdauer durch die Schockvorbehandlung berechnet. Die Einzelwerte wurden dann zu Mittelwerten zusammengefaßt.

Um für das vorliegende Versuchsmaterial (Kiemenepithel von *Mytilus edulis* aus der Ostsee) resistenzsteigernde Schocktemperaturen heraus^{zu}finden, wurde die Hitzeresistenz nach Schockvorbehandlung der Gewebe mit Temperaturen zwischen 26° und 35°C ermittelt. Abb. 11 zeigt die Ergebnisse. Eine Steigerung der Hitzeresistenz von im Mittel 11% ergibt sich bei der Schocktemperatur von 30°C . Niedrigere Schocktemperaturen von 26° und 28°C rufen unter diesen Versuchsbedingungen noch keine deutliche Änderung der Hitzeresistenz hervor. Vorbehandlung bei 32° und 34°C hat eine Abnahme der Hitzeresistenz zur Folge.

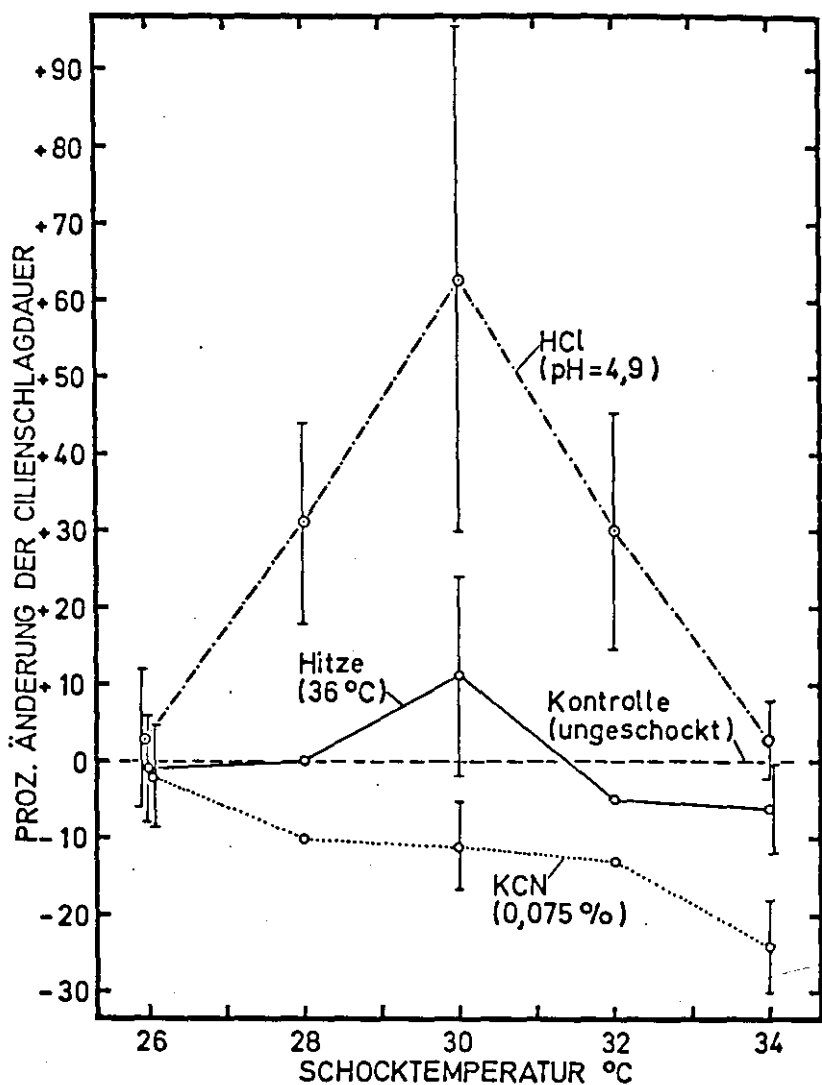


Abb. 11 : Einfluß einer Hitzeschockvorbehandlung auf die zelluläre Resistenz des isolierten Kiemengewebes von *Mytilus edulis* gegenüber :

- 1) Hitze (36°C)
- 2) Salzsäure in Meerwasser (pH 4,9)
- 3) Kaliumcyanid in Meerwasser (0,075%)

Dauer des Hitzeschocks : jeweils 10 Minuten; anschließend eine Erholungszeit von 10 Minuten im Meerwasser von 15°C. Angegeben ist die mittlere prozentuale Änderung der Cilienschlagdauer in Abhängigkeit von der Schocktemperatur im Vergleich zu den Kontrollwerten nicht geschockter Stücke aus jeweils demselben Tier. Die Mittelwertbildung erfolgte aus jeweils 10 Einzelmessungen. Die senkrechten Geraden geben die Standardabweichung an. Die Bestimmungen der "Giftresistenz" wurden bei 15°C durchgeführt. Die Versuchstiere stammten aus der Ostsee (Kieler Förde). Salzgehalt des Versuchsmediums 15‰. Versuchszeit : Januar 1967.

Außer der Hitzeresistenz wurde auch die Resistenz gleich stark geschockter Gewebestücke gegenüber Salzsäure und Kaliumcyanid bei 15°C gemessen. Gegenüber Salzsäure ergibt sich eine wesentlich stärkere Steigerung der Resistenz nach Hitzeschockvorbehandlung. Der maximale Effekt (63% Steigerung der Cilienschlagdauer) wird bei derselben Temperatur (30°C) erreicht, bei der auch eine deutliche Steigerung der Hitzeresistenz eintritt. Ein geringerer Anstieg der Resistenz gegenüber Salzsäure (um etwa 30%) ist auch für die benachbarten Temperaturen 28° und 32°C zu beobachten.

Die Cyanidresistenz des isolierten Kiemengewebes wird durch einen Hitzeschock erniedrigt. Bei zunehmender Schocktemperatur wird der Effekt größer.

Die Resistenz gegenüber Äthanol nach Vorbehandlung mit entsprechenden Hitzeschocks (vgl. Tab. 8) zeigt einen unregelmäßigen Verlauf in Abhängigkeit von der Schocktemperatur. Eine Schocktemperatur von 26°C bewirkt noch keine Veränderung der Cilienschlagdauer, dagegen hat eine solche von 28°C bereits eine Erniedrigung zur Folge. Nach einer Vorbehandlung mit 30° und 32°C reagieren die einzelnen Kiemenstücke sehr unterschiedlich, mit Erhöhung oder Erniedrigung der Cilienschlagdauer. Im Mittel ist kein Unterschied im Vergleich zu ungeschockten Stücken festzustellen. Vorbehandlung mit 34°C bewirkt eine starke Verringerung der Cilienschlagdauer in äthanolhaltigem Meerwasser.

Tabelle 8

Mytilus edulis aus der Ostsee. Einfluß einer Hitzeschockvorbehandlung auf die Resistenz des isolierten Kiemengewebes gegenüber Äthanol (12,5 Vol %). (Einzelheiten zur Versuchsdurchführung in der Legende zur Abb. 11). (Die Werte in Klammern geben die Standardabweichung an.)

Versuchszeit : Januar 1967.

Schocktemperatur (°C)	26	28	30	32	34
Änderung der Cilienschlagdauer (%)	-1(±7)	-10(±8)	+2(±15)	+5(±14)	-22(±8)

Tabelle 9

Mytilus edulis aus der Nordsee ($\sim 30^{\circ}/\text{oo S}$) und aus der Ostsee ($\sim 15^{\circ}/\text{oo S}$). Einfluß einer Hitzeschockvorbehandlung auf die Gefrierresistenz des isolierten Kiemengewebes. (Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere 1 Woche bei 10°C gehältert. Dauer des Hitzeschocks: jeweils 10 min, anschließend 10 min "Erholung" bei 15°C . Dann Untersuchung der Gefrierresistenz.) Versuchszeit: Januar 1969.

Schock- temperatur ($^{\circ}\text{C}$)		15	26	28	30	32	34	35
LD ₅₀ -Zeit bei -10°C (min)	Ostsee- Mytilus	8,5	8	8	7,5	7	7	6
	Nordsee- Mytilus	68	60	58	54	49	46	40

Weitere Untersuchungen an Kiemenstücken von *Mytilus* aus der Nord- und Ostsee im Januar 1969 ergaben, daß deren Überlebensdauer bei Einwirkung von Gefrieren durch Hitzeschockvorbehandlung nicht erhöht wird (vgl. Tab.9).

FRIEDRICH (1967) beobachtete allerdings nach einer bestimmten Einfrierdauer eine geringfügig erhöhte Cilienaktivität, wenn das Gewebe mit Hitzeschock vorbehandelt war. Dieser Befund könnte durch Verringerung der Schleimdecke auf den Kiemen bedingt gewesen sein.

Insgesamt wird deutlich, daß ein Hitzeschock die Resistenz des Muschelgewebes in weitaus geringerem Maße positiv beeinflusst, als es z.B. für pflanzliches Gewebe beschrieben worden ist. Die Änderung der Resistenz gegenüber Hitze und anderen in erster Linie denaturierend wirkenden Faktoren (z.B. Säurezusatz) (zum Mechanismus der Denaturierung vgl. JOLY, 1965) dürfte eng mit einer Stabilitätsänderung empfindlicher Enzyme verbunden sein (vgl. SERAVIN et al., 1965; FELDMAN, 1968).

4) Salzgehalt des Außenmediums, Temperatur- Salzgehalts-Kombinationen

Bei vielen relativ euryhalinen marinen Evertebraten wurde nach Anpassung der Tiere an Brackwasser eine erhöhte Resistenz gegenüber einer V e r d ü n n u n g des Außenmediums nachgewiesen (SCHLIEPER & KOWALSKI, 1956 a; SCHLIEPER, 1958; THEEDE, 1965; THEEDE & LASSIG, 1967). Gleichzeitig verringerte sich z.B. die Resistenz ganzer Organismen und isolierter Gewebe gegenüber anderen abiotischen Faktoren wie h o h e n S a l z k o n z e n - t r a t i o n e n (THEEDE, 1965; PRECHT & LINDNER, 1966; THEEDE & LASSIG, 1967), H i t z e (KINNE, 1954, 1963, 1964 a; McLEESE, 1956; SCHLIEPER & KOWALSKI, 1956 a, 1956 b; SCHLIEPER, 1958; TODD & DEHNEL, 1960; RESHÖFT, 1967; DREGOLSKAYA, 1961; MATUTANI, 1962; VOGEL, 1966; IVLEVA, 1967; THEEDE & LASSIG, 1967; FRIEDRICH, 1967), K ä l t e (THEEDE, 1965; THEEDE & LASSIG, 1967; KÄHLER, 1970; weitere Literaturangaben bei KINNE, 1963 und 1964 a), hohem hydrostatischen D r u c k (PONAT, 1967; NAROSKA, 1968; SCHLIEPER, 1968 a), O_2 - M a n g e l + H_2S (THEEDE et al., 1969). Bezüglich der zellulären Gefrierresistenz ergab sich im einzelnen, daß isoliertes Kiemenepithel der resistenteren Muschelarten aus dem Eulitoral der Nordsee (*Mytilus*, *Cardium*) im Winter bei $-10^{\circ}C$ bis zu einigen Stunden überlebt, während die Überlebensfähigkeit des entsprechenden Gewebes von Exemplaren aus der Ostsee (Kieler Förde) in der Größenordnung einiger Minuten liegt (Tab. 10). Dabei ist unter den Muscheln beider Standorte die zelluläre Gefrierresistenz von *Mytilus edulis* am größten.

Arten aus dem Finnischen Meerbusen, die dort bei einem Salzgehalt von etwa 6‰ in der Nähe ihrer Verbreitungsgrenze leben, haben nahezu ganz die Fähigkeit verloren Gefrieren zu ertragen. Exposition bei $-10^{\circ}C$ tötet hier isoliertes Kiemengewebe innerhalb von 2-4 Minuten ab. Die ökologische Folge dieser Resistenzverminderung bei Brackwasser-

Tabelle 10

Zelluläre Gefrierresistenz verschiedener Muschelarten von Fundorten aus Meer- und Brackwasser. Nach Exposition bei -10°C und anschließendem Auftauen wurde die Cilienaktivität isolierter Kiemenstücke bei 20°C beobachtet. Mittelwerte von jeweils 8-10 Einzeluntersuchungen.

A r t	50% der normalen Cilienaktivität wurde nach folgender Expositions-dauer (in Minuten) bei -10°C gefunden	Vollständiger Stillstand der Kiemen-cilien wurde nach folgender Expositions-dauer (in Minuten) bei -10°C gefunden
Dezember 1964 - Februar 1965*		
Mytilus edulis		
Nordsee ($30^{\circ}/\text{ooS}$)	120	330
Beltsee ($18^{\circ}/\text{ooS}$)	5,5	9
Cardium edule		
Nordsee ($30^{\circ}/\text{ooS}$)	65	210
Beltsee ($18^{\circ}/\text{ooS}$)	3,5	5,5
Mya arenaria		
Nordsee ($30^{\circ}/\text{ooS}$)	42	90
Beltsee ($18^{\circ}/\text{ooS}$)	2,8	4,5
Macoma balthica		
Nordsee ($30^{\circ}/\text{ooS}$)	35	100
Beltsee ($18^{\circ}/\text{ooS}$)	4,5	9
Oktober 1965 und 1966 **		
Mytilus edulis		
Nordsee ($30^{\circ}/\text{ooS}$)	35	80
Beltsee ($15^{\circ}/\text{ooS}$)	4	7
Finnischer Meerbusen ($6^{\circ}/\text{ooS}$)	2,3	3,5
Cardium edule		
Nordsee ($30^{\circ}/\text{ooS}$)	13	40
Beltsee ($15^{\circ}/\text{ooS}$)	3	5,5
Cardium lamarcki		
Finnischer Meerbusen ($6^{\circ}/\text{ooS}$)	1	2,5
Mya arenaria		
Nordsee ($30^{\circ}/\text{ooS}$)	21	45
Beltsee ($15^{\circ}/\text{ooS}$)	3	5
Finnischer Meerbusen ($6^{\circ}/\text{ooS}$)	1,8	2,7
Macoma balthica		
Nordsee ($30^{\circ}/\text{ooS}$)	12	30
Beltsee ($15^{\circ}/\text{ooS}$)	3,5	6
Finnischer Meerbusen ($6^{\circ}/\text{ooS}$)	2,2	4

* Nach THEEDE (1965)

** Nach THEEDE and LASSIG (1967)

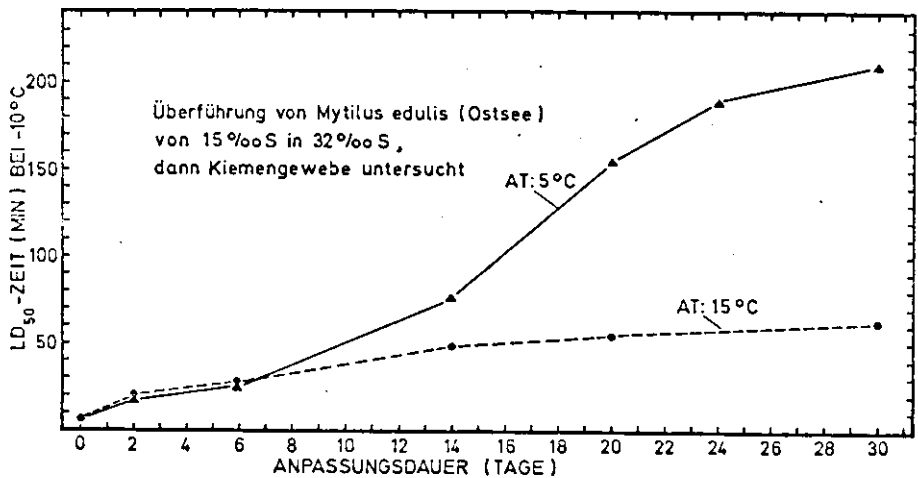


Abb. 12 : *Mytilus edulis* (Ostsee). Der zeitliche Verlauf der Änderung der Gefrierresistenz isolierter Kiemen nach Überführung ganzer Tiere aus 15‰ S und 15-17°C in 32‰ S und Hälterung darin bei 5°C und 15°C. Als Maß für die Gefrierresistenz diente die Expositionsdauer bei -10°C, nach der noch 50% der Gewebestücke überlebten. Versuchszeit : August/September 1969.

Exemplaren dürfte darin bestehen, daß die Muscheln z.B. in der eigentlichen Ostsee die winterliche Kälte nur so lange ertragen, wie sie von Wasser bedeckt bleiben. Individuen, die im Sommer ihren Standort zu nahe der Wasserlinie eingenommen haben, sterben bei dem ersten Niedrigwasser ab, wenn sie dabei niedrigen Temperaturen ausgesetzt werden, bei denen es zum Gefrieren kommt (THEEDE & LASSIG, 1967).

Die weitere Analyse dieser offensichtlich mit dem verringerten Salzgehalt des Fundortes zusammenhängenden Abnahme der zellulären Gefrierresistenz ergibt folgendes : Nach THEEDE (1965) wird die geringe Gefrierresistenz der isolierten Kiemen von *Mytilus edulis* aus der Ostsee durch mehrwöchige Anpassung der Versuchstiere an Nordseewasser (AS 32°/oo; AT 5°C) beträchtlich gesteigert. Andererseits nimmt die Gefrierresistenz des Gewebes von Exemplaren aus der Nordsee nach Überführung in Brackwasser (AS 15°/oo; AT 5°C) in ähnlich langer Zeit annähernd auf die bei Brackwasser-Muscheln gefundene Höhe ab. Die Gefrierresistenz wird auch etwas gesteigert oder verringert, wenn der Salzgehalt des Außenmediums relativ kurze Zeit vor der Resistenzmessung (z.B. 15 h vorher) erhöht oder erniedrigt wird. Diese Resistenzänderungen sind aber wesentlich geringer als nach langfristiger Anpassung an die oben erwähnten Temperatur-Salzgehalts-Bedingungen (THEEDE, 1965, dort Tab. 5).

In den folgenden Experimenten sollte der Mechanismus weiter analysiert werden, der den kombinierten Temperatur-Salzgehaltswirkungen bei der Gefrierresistenzadaptation zugrunde liegt. In einer Versuchsreihe wurde die Anpassung von Ostsee-*Mytilus* aus Brackwasser von 15°/oo S an Meerwasser von 30°/oo S bei 5°C und 15°C durchgeführt und der zeitliche Verlauf der Gefrierresistenzänderung bei beiden Anpassungstemperaturen an herausgeschnittenen Gewebestücken verfolgt (Abb. 12). Es zeigt sich, daß bei 15°C die Zunahme der Gefrierresistenz eher (nach etwa 2 Wochen) abgeschlossen ist, während sie bei 5°C länger (3-4 Wochen) anhält und im

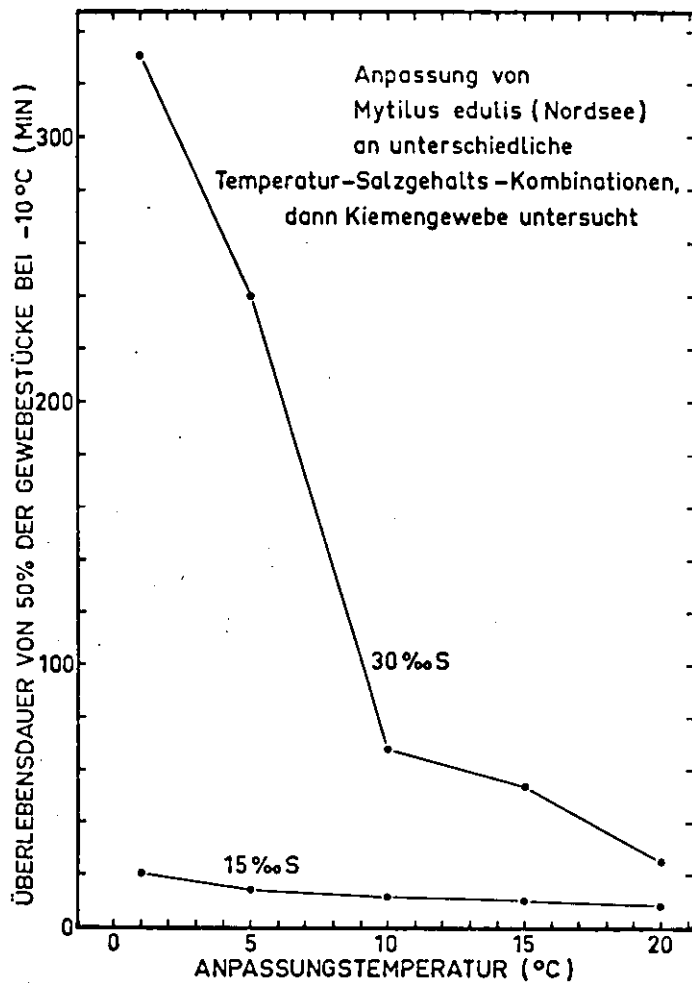


Abb. 13: *Mytilus edulis* (Nordsee). Abhängigkeit der Gefrierresistenz der isolierten Kiemen von verschiedenen Temperatur-Salzgehalts-Kombinationen während der Vorbehandlung der ganzen Tiere. Anpassungsdauer an die einzelnen AT-AS-Stufen: 24 Tage. Als Maß für die Gefrierresistenz diente die Expositionsdauer bei -10°C, nach der noch 50% der Gewebestücke überlebten. Versuchszeit: August/September 1969.

Endergebnis zu einer wesentlich stärkeren Resistenzzunahme führt. Die Resistenzsteigerung bei Anpassung an erhöhten Salzgehalt, kombiniert mit niedriger Temperatur dauert länger an, als wenn bei der Kälteadaptation Versuchstiere aus annähernd normalem Meerwasser benutzt werden und der Salzgehalt ihres Mediums unverändert bleibt.

In einer anderen Versuchsreihe wurden Miesmuscheln aus der Nordsee bei den Temperatur-Salzgehalts-Kombinationen 1,5 10, 15 und 20°C sowie 15‰ S und 30‰ S über 24 Tage gehalten, dann wurde die Gefrierresistenz ihrer isolierten Kiemengewebe untersucht (Abb. 13). Hierbei zeigte sich folgendes : Nach Hälterung bei 15‰ S in Kombination mit den verschiedenen Anpassungstemperaturen ist die Gefrierresistenz in allen Fällen wesentlich geringer als bei Tieren aus 30‰ S. Niedrige Anpassungstemperatur hat bei AS 15‰ nur eine geringfügige Erhöhung der Gefrierresistenz zur Folge. Die Resistenzzunahme ist so gering, daß ich ihr keine nennenswerte ökologische Bedeutung zuschreiben möchte. Erst durch das Zusammenwirken von hohem Anpassungssalzgehalt (30‰ S) und niedriger Anpassungstemperatur (5° bzw. 1°C) wird eine ähnliche hohe Gefrierresistenz hervorgerufen wie sie Miesmuscheln aus dem Wattenmeer im Winter aufweisen. Bei höherer AT (20°C) ist nur ein relativ geringer durch den Anpassungssalzgehalt bedingter Unterschied der Gefrierresistenz vorhanden.

In Tab. 11 wird die Gefrierresistenz des Kiemengewebes von *Mytilus* aus der Nordsee nach Anpassung der Versuchstiere an 5°C und unterschiedliche Salzgehalte wiedergegeben. Nach 24tägiger Anpassung der Tiere an die einzelnen Salzgehaltsstufen (Ostsee-*Mytilus* im Bereich von 15-35‰ S, Nordsee-*Mytilus* von 15-45‰ S, bei darüberhinausgehenden Salzgehalten weist das Gewebe deutliche Schädigungen auf) ist die Gefrierresistenz des Kiemengewebes jeweils bei den höchsten erwähnten Salzgehaltswerten am größten. Durch die langfristige Anpassung der Ostsee-Individuen an die unterschiedlichen

Salzgehaltsbedingungen wird aber nur teilweise die Resistenz der Nordseetiere erreicht. In dem höheren Salzgehaltsbereich von 35-45⁰/oo ist die Resistenz der Muscheln aus der Nordsee deutlich größer. Bei den Ostsee-Individuen waren die Kiemengewebe nach direkter Überführung der Tiere und anschließender Hälterung in 45⁰/oo S bereits geschädigt.

Tabelle 11

Mytilus edulis aus der Nordsee (etwa 30⁰/oo S) und aus der Ostsee (etwa 15⁰/oo S). Die Gefrierresistenz der isolierten Kiemen bei -10°C nach Anpassung der Tiere an verschiedene Salzgehalte bei 5°C. Dauer der Voranpassung: 24 Tage. Versuchszeit : September 1969.

Anpassungs- salzgehalt /oo S	Kiemengewebe LD ₅₀ -Zeit bei -10°C (min)	
	Nordsee-Individuen	Ostsee-Individuen
15	14	12
25	155	130
35	318	195
45	468	*

* Tiere geschädigt

5) Ionenwirkungen

Die Lebensfähigkeit einer marinen Art im Brackwasser wird beeinträchtigt, wenn der osmotische Wert des Außenmediums oder ^{die} Konzentration eines Ions bzw. mehrerer Ionen unter das artspezifisch lebensnotwendige Minimum absinkt (vgl. NEUMANN, 1962). In einzelnen Fällen können die schädigenden Wirkungen extrem herabgesetzter Salzgehalte auf marine Tiere und deren Gewebe durch einen erhöhten Ca-Gehalt im Außenmedium vermindert werden (HOHENDORF, 1963). Auch von einer Steigerung der Hitzeresistenz durch erhöhten Ca-Gehalt im Außenmedium wurde mehrfach berichtet (CHALKLEY, 1930; SCHEIBMAIR, 1938; SCHLIEPER et al., 1952; SCHLIEPER & KOWALSKI, 1956 a,b). Im einzelnen kommt es dabei sehr auf die Konzentration der zugesetzten Ionen an. Nach SCHLIEPER & KOWALSKI (1956 b) wird die Hitzeresistenz isolierter Kiemengewebe der poikilosmotischen Miesmuschel aus dem Brackwasser (15⁰/ooS) durch Zusätze geringer Mengen an Ca- oder Mg-Ionen vergrößert, durch erhöhten K-Gehalt im Außenmedium hingegen verringert. Wie die Ergebnisse bezüglich der Ca-Wirkung im einzelnen erkennen lassen, ist dabei in erster Linie das vom Gewebe aufgenommene Ca maßgebend. Zur Deutung werden im wesentlichen die Vorstellungen von BOGEN (1948) und HEILBRUNN (1930 und 1952) über Ionenwirkungen auf Hydratation und Stabilität der Proteinmoleküle sowie auf die Permeabilität herangezogen. Es ist denkbar, daß eine gewisse stabilisierende Wirkung durch Bindung von Ca und Mg z.B. an den Karboxylgruppen der Eiweiße zustande kommt (vgl. GIESE, 1968, S. 100). Nach Befunden von VOLGEL (1966) steigert erhöhter Mg-Gehalt bei einem Ausgangssalzgehalt von 20⁰/oo die Hitzeresistenz des Ciliaten *Zoothamnium hiketes*, ist aber ohne deutlichen Einfluß auf dessen Gefrierresistenz. Calciumzusatz bei dieser Art vermindert Hitze- und Gefrierresistenz.

Aus den Untersuchungen von KÄHLER (1970) über den Einfluß erhöhter Gehalte an Na-, K-, Ca- und Mg-Ionen auf Hitze- und Gefrierresistenz des im Strandanwurf

häufigen Oligochaeten Enchytraeus albidus geht deutlich hervor, daß die Auswirkungen solcher Ionenzusätze auf die Resistenz auch von der Anpassungstemperatur abhängig sind. Auffallend ist z.B., daß bei der AT 23°C ein geringer Ca-Zusatz zum Außenmedium die Gefrierresistenz steigert, bei der AT 5°C dagegen senkt. Für die Wirkung der Ca-Ionen ist außerdem der Gesamtsalzgehalt von Bedeutung. Mit steigendem Ausgangssalzgehalt wird die Wirkung eines Ca-Zusatzes geringer, von 30⁰/oo S an aufwärts ist bei Enchytraeus albidus ^{keine}signifikante Beeinflussung der Gefrierresistenz durch Ca-Zusatz mehr festzustellen.

Tabelle 12

Wirkung einer Hälterung der Versuchstiere in Meerwasser mit erhöhtem Gehalt an K-, Ca- oder Mg-Ionen auf die Gefrierresistenz isolierter Kiemenstücke.
Versuchszeit : September 1970.

Mytilus edulis aus der Ostsee (AS 15 ⁰ /oo, AT 15 ⁰ C, Anpassungsdauer 3 Wochen)	Zugefügte Salze	Gefrierresi- stenz (LD ₅₀ -Zeit bei -10 ⁰ C (min))
Nach weiteren 3 Tagen Vorbehand- lung bei 15 ⁰ C in :		
15 ⁰ /oo S (Kontrolle)		8
15 ⁰ /oo S + 100% K	0,319 g/l KCl	12
15 ⁰ /oo S + 100% Ca	0,679 g/l CaCl ₂ ·2H ₂ O	8,5
15 ⁰ /oo S + 100% Mg	4,695 g/l MgCl ₂ ·6H ₂ O	11,5
Mytilus edulis aus der Nordsee (AS 30 ⁰ /oo, AT 15 ⁰ C, Anpassungsdauer 3 Wochen)		
Nach weiteren 3 Tagen Vorbehand- lung bei 15 ⁰ C in :		
300 ⁰ /oo S (Kontrolle)		75
300 ⁰ /oo S + 50% Ca	0,319 g/l CaCl ₂ ·2H ₂ O	67
300 ⁰ /oo S + 100% Ca	0,638 g/l CaCl ₂ ·2H ₂ O	62
AT 5 ⁰ C (3 Wochen) Nach weiteren 3 Tagen Vorbehandlung bei 5 ⁰ C in :		
300 ⁰ /oo S (Kontrolle)		320
300 ⁰ /oo S + 50% Ca	0,319 g/l CaCl ₂ ·2H ₂ O	275
300 ⁰ /oo S + 100% Ca	0,638 g/l CaCl ₂ ·2H ₂ O	245

Tabelle 13

Abra alba (Ostsee). Vergleich der Abkühlungsresistenz isolierter Kiemenstücke im Meerwasser von 15°/oo S mit und ohne Zusatz von Ca-Ionen. Vor dem Versuch wurden die Tiere 2 Wochen bei 15° C in Wasser von 15°/oo S gehalten.

Vorbehandlung	Anzahl überlebender Kiemenstücke von jeweils 10 Exemplaren nach folgender Expositionsdauer bei -3° C in Minuten					
	100	500	1000	1500	2000	3000
weiterg 3 Tage bei 15° C in:						
15°/oo S	10	7	4	2	0	0
15°/oo S +100 % Ca	10	10	10	6	4	0

Zur Untersuchung der Auswirkungen von Ionenzusätzen zum Meerwasser auf die zelluläre Gefrierresistenz von Muscheln wurden Exemplare von *Mytilus edulis* 3 Wochen an konstante Temperatur- und Salzgehaltsbedingungen angepaßt (vgl. Tab. 12) und dann weitere 3 Tage in den Medien gehalten, deren Zusammensetzung durch Zufügen der in Tab. 12 angegebenen Salze verändert war. Versuche mit herausgeschnittenen Kiemenstücken von Ostsee-*Mytilus* ergaben, daß die zelluläre Gefrierresistenz bei Zusatz von 100 % K geringfügig gesteigert wird. Erhöhung des Mg-Gehaltes um 100 % hat eine Resistenzsteigerung zur Folge wie sie annähernd auch durch eine Zunahme des Salzgehaltes um 2°/oo S verursacht wird (LD₅₀-Zeit bei 18°/oo S: 11 min). Durch 100 % Ca-Zusatz wird die zelluläre Gefrierresistenz nicht eindeutig geändert. Bei Kiemengewebe von Exemplaren aus der Nordsee (AT 5° und 15° C) hat Ca-Zusatz eine Abnahme der Gefrierresistenz zur Folge. Gewebestücke der kaltangepaßten Tiere zeigen diese Verringerung noch ausgeprägter. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen erhöht sich die Abkühlungsresistenz isolierter Kiemenstücke von *Abra alba* bei -3° C durch Ca-Zusatz zum Außenmedium (Tab. 13).

6) Luftexposition

Nordsee-Individuen der Miesmuschel, welche im Eulitoral während der Ebbeperioden der Luft ausgesetzt sind, halten die Schalen geschlossen, reduzieren Herz- und Cilientätigkeit, bzw. stellen diese ganz ein und gehen, wenn die Sauerstoffreserven erschöpft sind, zu anaerobem Stoffwechsel über (SCHLIEPER, 1958; SCHLIEPER & KOWALSKI, 1955). Sie können in diesem Zustand viele Tage überleben (THAMDRUP, 1935; THEEDE, 1963). Manchmal kann man beobachten, daß sie den Schalenspalt minimal offenhalten, so daß auch ein gewisser Gasaustausch mit der Luft möglich ist (vgl. READ, in : WILBUR & YONGE, 1964).

Um die Veränderungen der zellulären Gefrier- und Hitzeresistenz während des Trockenliegens zu erfassen, wurden Miesmuscheln unterschiedlich lange jeweils in einem temperaturkonstanten Raum bei $+5^{\circ}\text{C}$ und in einem Brutschrank bei $+20^{\circ}\text{C}$ an der Luft gehalten. Zwei litorale Arten von der amerikanischen Atlantikküste, *Crassostrea virginica* und *Brachidontes exustus*, wurden bei der Zimmertemperatur von $23,5^{\circ}\text{C}$ trockengelegt. Kontrolltiere befanden sich bei den angegebenen Temperaturen in belüftetem Meerwasser in Glasaquarien. In Abständen von einigen Tagen wurden dann Resistenzuntersuchungen an isolierten Kiemenstücken durchgeführt. Dabei wurden nur Gewebestücke solcher Tiere verwendet, die ihre Schalen geschlossen halten konnten oder auf mechanische Reizung hin mit Schalenschluß reagierten.

Im einzelnen ergibt sich folgendes (vgl. Abb. 14) : Isoliertes Kiemengewebe von *Mytilus edulis* aus der Nordsee erweist sich schon als geringfügig gefrierresistenter, wenn es Tieren entnommen ist, die vorher 1 Tag bei 5°C oder 20°C trocken an der Luft gelegen haben. Bei 20°C ist nach 4 Tagen Luftexposition der größte Resistenzanstieg festzustellen. Nach 7 Tagen Luftaufenthalt bei dieser Temperatur hat die Gefrierresistenz schon wieder etwas abgenommen. Luftaufenthalt der Miesmuscheln bei 5°C hat einen langsameren Resistenzanstieg zur Folge.

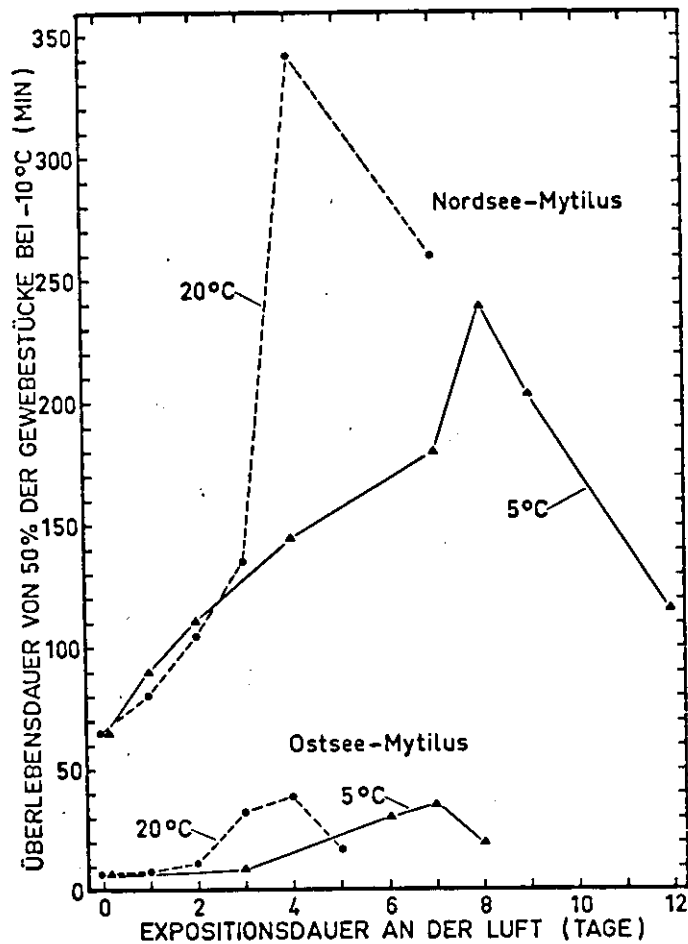


Abb. 14 : *Mytilus edulis* aus der Nord- und Ostsee.
Einfluß einer Luftexposition der ganzen
Muscheln bei 5°C (rel. Luftfeuchte etwa 75%)
und 20°C (rel. Luftfeuchte etwa 85%) auf die
Gefrierresistenz des isolierten Kiemengewebes.
Versuchszeit : Mai/Juni 1970.

Die Gefrierresistenz erreicht nach etwa 8 Tagen Luftexposition bei dieser Temperatur ihr Maximum. Die nach längeren Expositionszeiten wieder einsetzende Abnahme der Resistenz ist wohl auf beginnende Schädigungen des Gewebes zurückzuführen.

Bei Exemplaren aus der Ostsee ($15^{\circ}/_{\infty}$ S) liegt die prozentuale Steigerung der zellulären Gefrierresistenz, bezogen auf den Ausgangswert, in ähnlicher Größenordnung. Die absolute Höhe der Resistenz bleibt aber gering im Vergleich zu der der Nordsee-Individuen. Auch bei *Crassostrea virginica* und *Brachidontes exustus* treten beträchtliche Steigerungen der zellulären Gefrierresistenz nach mehrtägigem Trockenliegen der Tiere auf (Tab. 14).

Wie weitere Untersuchungen am Kiemengewebe von *Mytilus* ergaben, ist auch die zelluläre Hitzeresistenz nach Luftaufenthalt der Tiere erhöht (Tab. 15). Dabei ist der zeitliche Verlauf der Resistenzänderung ähnlich wie bei der Gefrierresistenz.

Tabelle 14

Einfluß von mehrtägiger Luftexposition ganzer Muscheln auf die Gefrierresistenz des isolierten Kiemengewebes. Versuchszeit : November/Dezember 1967.

Art Versuchsbedingung	LD ₅₀ -Zeit isolierter Gewebestücke bei -10°C (min)
<i>Crassostrea virginica</i> aus Meerwasser ($32,3^{\circ}/_{\infty}$ S; $23,5^{\circ}\text{C}$)	40
Luftexposition (bei $23-24^{\circ}\text{C}$)	
1 Tag	52
4 Tage	150
10 Tage	125
<i>Brachidontes exustus</i> aus Meerwasser ($32,3^{\circ}/_{\infty}$ S; $23,5^{\circ}\text{C}$)	17
Luftexposition (bei $23-24^{\circ}\text{C}$)	
2 Tage	23
6 Tage	32

Tabelle 15

Einfluß von Luftexposition der ganzen Muscheln auf die Hitzeresistenz des isolierten Kiemengewebes. Die Tiere wurden vor dem Versuch bereits 2 Wochen bei den beiden unterschiedlichen Versuchstemperaturen gehalten. (Mittelwerte aus jeweils 10 Einzeluntersuchungen. In Klammern Standardabweichungen.)
Versuchszeit : August 1970.

Mytilus edulis	Mittlere Cilienschlagdauer bei Hitzeeinwirkung (36°C) (min)
aus Meerwasser (30°/oo S; 5°C)	88 (±21)
Luftexposition (bei 5°C)	
1 Tag	101 (±29)
4 Tage	136 (±35)
8 Tage	178 (±46)
12 Tage	112 (±41)
aus Meerwasser (30°/oo S; 20°C)	107 (±26)
Luftexposition (bei 20°C)	
2 Tage	158 (±42)
4 Tage	205 (±67)
6 Tage	168 (±54)

Bei 20°C erfolgt der Resistenzanstieg schneller und ist im Endeffekt stärker als bei der niedrigen Temperatur.

Zur weiteren Analyse der Resistenzerhöhungen wurden während der Luftexposition auftretende Gewichtsänderungen der Tiere bestimmt und außerdem die osmotischen Werte der Mantelhöhlenflüssigkeit und des zwischen Mantel und Schale befindlichen Innenmediums gemessen (Tab. 16). Hierzu wurde das Halbmikro-Osmometer nach KNAUER (Berlin) benutzt. (Anmerkungen zur Methode z.B. bei THEEDE, 1969 a). Die Entnahme des Innenmediums erfolgte mit einer Injektionsspritze. Es zeigt sich, daß das Gesamtgewicht der Muscheln bei Luftaufenthalt schon innerhalb einiger Tage deutlich abnimmt. Diese Gewichtsabnahme ist auf Wasserverluste zurückzuführen. Es

Tabelle 16

Mytilus edulis aus der Nordsee ($\sim 30^{\circ}/_{\infty}$ S).
Einfluß mehrtägiger Luftexposition ganzer Muscheln
($5,7 \pm 0,1$ cm Schalenlänge) auf das Gesamtgewicht der
Tiere und die osmotische Konzentration der Mantel-
höhlenflüssigkeit und des Blutes. Messungen an
10 Exemplaren. In Klammern sind die Standardabweichun-
gen angegeben.
Versuchszeit : Mai/Juni 1970.

Dauer des Luftaufenthaltes bei 5°C (Tage)	0	2	6
Gesamt-Lebendgewicht (g)	23,78 ($\pm 0,94$)	21,32 ($\pm 1,25$)	19,40 ($\pm 1,31$)
Gewichtsänderung (bezogen auf das Anfangsgew. (%))		10,29	18,4
Osmotischer Wert des Mantelhöhlenwassers (m Osm/kg)	879 (± 52)	914 (± 76)	986 (± 84)
Osmotischer Wert des Blutes (m Osm/kg)	893 (± 48)	925 (± 71)	994 (± 86)

handelt sich dabei, wie an einzelnen Wassertropfen auf
der Unterlage der Muscheln zu erkennen war, z.T. um
direkt ausgetretene Mantelhöhlenflüssigkeit. Die osmo-
tischen Werte weisen aber ebenfalls auf Konzentrierungs-
effekte hin.

7) Sauerstoffmangel

Weitere Untersuchungen sollten zeigen, wie die Gefrierresistenz allein durch Halten der Tiere in einem sauerstoffarmen Medium beeinflusst wird, ohne daß dabei - wie im vorigen Kapitel behandelt - Konzentrationserhöhungen des Mantelhöhlenwassers durch Verdunstung auftreten. Die Miesmuschel, mit der die Versuche durchgeführt wurden, weist eine hohe Resistenz gegenüber O_2 -Mangel auf (vgl. THEEDE et al., 1969). Diese beruht wahrscheinlich auf der Fähigkeit der Tiere, noch bei sehr geringen Gasspannungen O_2 aufzunehmen, ihren Energieverbrauch stark zu drosseln und den Restbedarf lange Zeit durch anaerobe Energiefreisetzung bestreiten zu können. FRIEDRICH (1967) beobachtete vorübergehende Erhöhungen der Hitzeresistenz nach 1-2stündigem Aufenthalt isolierter Gewebestücke in O_2 -armem Meerwasser, außerdem ein etwas besseres Überleben (mit größerer Cilienaktivität) nach Einfrieren und Auftauen.

Aus dem Medium, in dem die Versuchstiere längere Zeit bei O_2 -Mangel gehalten werden sollten, wurde der Sauerstoff durch Einleiten von Reinst-Stickstoff so lange ausgetrieben, bis nur noch weniger als 0,15 ml O_2 /l gelöst waren. Dies wurde mit Hilfe der Winkler-Methode (vgl. SCHLIEPER, 1968b) überprüft. Das sauerstoffarm gemachte Meerwasser wurde dann mittels Überlaufschlauch in einzelne 250 ml-Flaschen abgefüllt, die jeweils 5 Versuchstiere enthielten und geschlossen wurden. In Abständen von mehreren Tagen wurden die Tiere herausgenommen und die Gefrierresistenz der herausgeschnittenen Kiemenstücke untersucht (vgl. Tab. 17).

Als Ergebnis zeigen sich deutliche Resistenzsteigerungen. Miesmuscheln aus der Nordsee ($\sim 30^\circ/00$ S) zeichnen sich nach Hälterung in sauerstoffarmem Meerwasser von $5^\circ C$ durch eine wesentlich höhere zelluläre Gefrierresistenz aus als in dem von $15^\circ C$. Der relative Resistenzgewinn im Vergleich zu Kontrollen aus belüftetem Meerwasser ist allerdings bei 15° -Tieren größer als bei Exemplaren aus $5^\circ C$. Individuen aus der Ostsee ($\sim 15^\circ/00$ S) reagieren

Tabelle 17

Mytilus edulis aus der Nord- und Ostsee.

Einfluß der Hälterung der Muscheln in O₂-armem Meerwasser (< 0,15 ml O₂/l) auf die Gefrierresistenz des isolierten Kiemenepithels.

Versuchszeit : Juli 1970.

Her- kunft der Tiere	Vorbehandlungs- bedingungen	Häl- terungs- dauer	Gefrierresistenz isolierter Kiemen- stücke LD ₅₀ -Zeit bei -10°C (min)	
			Vorbehand- lung bei O ₂ -Mangel	Kontrollen (aus belüf- tetem Meerwasser)
Nordsee (Büsum)	30°/ooS, 5°C	1	-	49
	" "	6	210	80
	" "	12	325	180
	" 15°C	6	155	46
Ostsee (Kieler Förde)	Nach dem Fang	0	-	6
	15°/ooS, 5°C	6	11	9
	" "	20	16	12
	" 15°C	6	10	7

dagegen bei Aufenthalt im O₂-armen Medium nur mit sehr geringer Zunahme der zellulären Gefrierresistenz, die wesentlich hinter Werten zurückbleibt, die nach Luftexposition der Tiere erreicht werden.

8) Gefrierschutzsubstanzen

Durch die Vorbehandlung mit bestimmten Gefrierschutzsubstanzen kann die Überlebensfähigkeit isolierter Gewebe mariner Evertebraten bei niedrigen Temperaturen, die mit Eisbildung verbunden sind, erheblich gesteigert werden (vgl. THEEDE, 1965). Der Wirkungsmechanismus der bereits vielfältig erprobten Stoffe ist schon von zahlreichen Autoren erörtert worden (Literatur bei NASH, in : MERYMAN, 1966) und befindet sich noch in der Diskussion (vgl. MERYMAN, 1970; FARRANT & WOOLGAR, 1970; sowie "General Discussion" in WOLSTENHOLME & O'CONNOR, Eds., 1970 : The frozen cell, S. 294-308). Im Rahmen dieser Arbeit sollten weitere Versuche über die Wirkung von Gefrierschutzsubstanzen auf das Gewebe mariner Muscheln unternommen werden, da auch beim Zustandekommen der hohen winterlichen Gefrierresistenz in der freien Natur organische Komponenten eine Rolle spielen könnten, die in der Wirkung den Gefrierschutzsubstanzen vergleichbar sind (vgl. WILLIAMS, 1967, 1968; MERYMAN, 1970).

Vorversuche ergaben, daß solche Substanzen (z.B. Glycerin, Dimethylsulfoxid) ihre schützende Wirkung bei isoliertem Gewebe nur dann voll entfalten, wenn sie während des Gefriervorganges im Außenmedium vorhanden sind und wenn das Gewebe vorher eine gewisse Zeit mit ihnen vorbehandelt wurde. Diese Tatsache wurde bei den folgenden Versuchen berücksichtigt. Isoliertes Kiemengewebe warm- und kaltangepaßter Miesmuscheln (AT 5° und 15°C) wurde jeweils 1 h in den Stufen einer Verdünnungsreihe von 2,5 bis 0,25 Mol Glycerin/l Meerwasser (30°/oo S) vorbehandelt. Dann wurde die Gefrierresistenz in diesen Medien bei -25°C ermittelt. Die Ergebnisse (Abb. 15) lassen erkennen, daß die Resistenz der Gewebe von warmangepaßten Muscheln schon nach Vorbehandlung mit einem Glycerinzusatz von 0,25 Mol/l stark ansteigt. Bei einem Glyceringehalt des Mediums von 0,5 Mol/l überleben die Gewebestücke der warmangepaßten Tiere bei -25°C etwa so lange wie die Gewebe der kaltangepaßten Tiere in reinem Meerwasser. Der prozentuale Anstieg der Resistenz bis zum Erreichen des Maximums, das bei einem Glyceringehalt

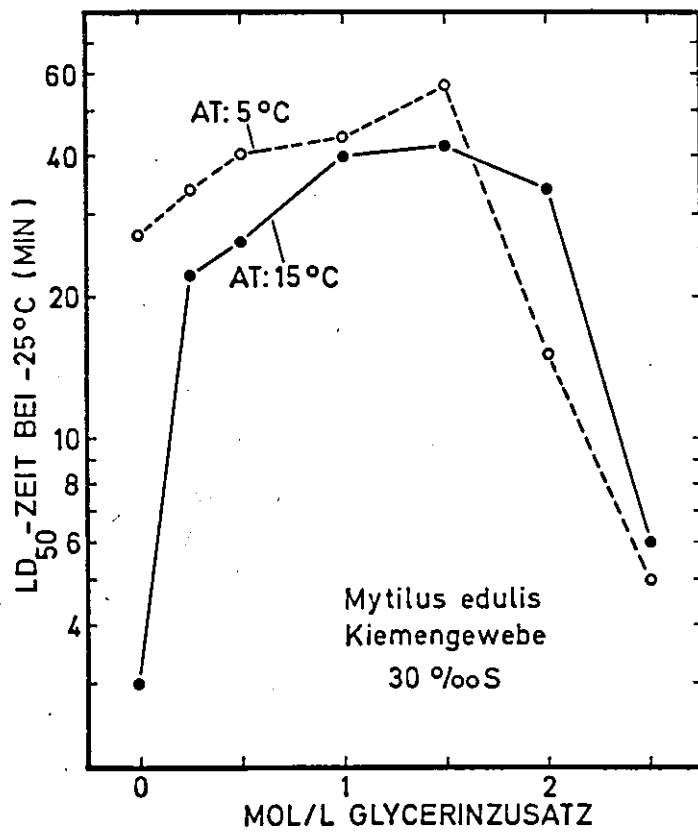


Abb. 15 : *Mytilus edulis* aus der Nordsee. Der Einfluß unterschiedlicher Glycerinkonzentrationen im Meerwasser auf die Gefrierresistenz isolierter Kiemenstücke warm- und kaltangepaßter Tiere. Anpassungsdauer an die unterschiedlichen Temperaturen : 3 Wochen. Jeweils 1 h vor Beginn der Gefrierversuche wurden die isolierten Gewebestücke bei 10°C in das glycerinhaltige Medium überführt. Versuchszeit : August/September 1970.

von 1-1,5 Mol/l auftritt, ist beim Gewebe der warmangepaßten Tiere größer, so daß bei diesen höheren Glycerinkonzentrationen der durch die Temperaturadaptation bedingte Resistenzunterschied geringer wird. Bei zu hohem Glyceringehalt des Mediums nimmt die Gefrierresistenz wieder ab. Ein solcher Effekt wurde beim Gewebe der kaltangepaßten Tiere schon bei der Glycerinkonzentration von 2 Mol/l, bei dem der warmangepaßten bei 2,5 Mol/l beobachtet.

Wie die in Tab. 18 aufgeführten Ergebnisse zeigen, überleben isolierte *Mytilus*-Kiemestücke unterschiedliche Kälteexposition zwischen -5° und -30°C nach Glycerinzusatz in diesem Temperaturbereich deutlich länger. Allerdings tritt die Schutzwirkung des Glycerins unter den Versuchsbedingungen bei den stärkeren Kältegraden etwas weniger in Erscheinung.

Tabelle 18

Mytilus edulis (Nordseetiere). Der Einfluß eines Glycerinzusatzes von 1 Mol/l zum Außenmedium (Meerwasser von $30^{\circ}/\text{oo S}$) auf die Gefrierresistenz der Kiemengewebe bei unterschiedlichen Kühlbadtemperaturen. (Vorbereitung der Tiere : 2 Wochen Hälterung bei $30^{\circ}/\text{oo S}$ und 15°C . Die Kiemestückchen wurden jeweils 1 h vor Beginn der Gefrierversuche bei Zimmertemperatur von etwa 20°C in das glycerinhaltige Medium überführt. Bei den Kühlbadtemperaturen von -5° und -10°C wurde das Gefrieren der Proben nach 1 min durch "Impfen" mit Eiskristallen eingeleitet.) Versuchszeit : August/September 1970.

Kühlbadtemperatur $^{\circ}\text{C}$	LD ₅₀ - Zeit in min	
	Untersuchung in Meerwasser ($30^{\circ}/\text{oo S}$)	in Meerwasser ($30^{\circ}/\text{oo S}$) + Glycerin- zusatz
- 5	120	680
- 10	70	310
- 20	18	75
- 30	3	8

Kiemengewebe von *Mytilus* aus der Ostsee (15°/oo S) zeigt eine prozentual stärkere Resistenzserhöhung nach Vorbehandlung mit glycerinhaltigem Außenmedium als das der Nordseeindividuen (Tab. 19). Die Schutzwirkung eines Zusatzes von Dimethylsulfoxid (DMSO) ist ähnlich stark wie die von Glycerin.

Tabelle 19

Die Wirkung eines Zusatzes von Glycerin (Mol.-Gew. 92,10) oder von Dimethylsulfoxid (Mol.-Gew. 78,13) zum Außenmedium auf die Gefrierresistenz isolierter Kiemengewebe von Muscheln aus Meer- und Brackwasser. (Die Tiere wurden 2 Wochen vor den Experimenten bei 10°C im Meerwasser von 30 bzw. 15°/oo S gehalten. Jeweils 1 h vor Beginn der Gefrierversuche wurden die isolierten Gewebestücke bei Zimmertemperatur von 20-22°C in das glycerinhaltige oder DMSO-haltige Medium überführt. Eisbildung wurde jeweils 1 min nach Abkühlungsbeginn durch "Impfen" ausgelöst. Versuchszeit : Augsut 1970).

Mytilus edulis Kiemengewebe	LD ₅₀ - Zeit isolierter Gewebestücke bei -10°C (min)
(Herkunft : Ostsee) in Meerwasser von 15°/oo S	9
+ 0,5 M/l Glycerin	45
+ 0,5 M/l DMSO	49
(Herkunft : Nordsee) in Meerwasser von 30°/oo S	75
+ 0,5 M/l Glycerin	240
+ 0,5 M/l DMSO	190

III. Analyse der Gefrierresistenz mit Hilfe von Enzymtests

Um beim Gewebe mariner Lamellibranchier weitere Einblicke in die Art der Gefrierschäden zu erhalten, wurde die Freisetzung von Enzymen aus Zellen und besonders empfindlichen Zellorganellen, den Lysosomen, nach Einwirkung von Gefrieren und Auftauen messend verfolgt. Hierzu wurden isolierte Muschelkiemen nach dem Herauspräparieren vorsichtig auf reinem Fließpapier abgetupft, in Meerwasser überführt und dann unter genau kontrollierten Bedingungen eingefroren. Die einzelnen Proben wurden so angesetzt, daß jeweils $1/10$ des Gesamtvolumens aus Gewebe und $9/10$ aus Meerwasser bestand (0,5 ml Gewebe + 4,5 ml Meerwasser). Mit Hilfe eines Thermistors wurde der Temperaturverlauf während des Gefrier- und Auftauvorganges unter Kontrolle gehalten. In Abständen, die nach dem Verlauf der Temperaturkurven als zweckmäßig erschienen, wurden die Gewebeproben aufgetaut. Nach 10 min Wartezeit wurden Gewebeproben entnommen, bei denen dann im einzelnen entweder die Cilienaktivität untersucht oder nach 15 min Zentrifugieren der Proben im Überstand die Aktivitäten einiger aus dem Gewebe ausgetretener Enzyme gemessen wurden. Hierbei handelt es sich um die im Zytoplasma der Zellen lokalisierte Aldolase und die in den Lysosomen befindliche saure Phosphatase. Die Enzymbestimmungen erfolgten wie in Kap. C (Methoden) angegeben.

1) Vergleichende Untersuchungen bei unterschiedlich gefrierresistenten Arten

Kiemen der gefrierresistenten Muschel *Mytilus edulis* und der frostempfindlichen Art *Spisula solida* (beide aus der Nordsee) wurden unterschiedlich lange der Kühlbadtemperatur von $-10,3^{\circ}\text{C}$ ausgesetzt. Die Temperaturmessungen ließen erkennen, daß der Gefriervorgang in den Probebehältern bei dieser Temperatur im Thermostatenbad innerhalb von 2-3 Minuten eingeleitet wurde. Während längerer Versuchsdauer sank die Temperatur in den Proben auf etwa $0,2^{\circ}\text{C}$ oberhalb der Kühlbadtemperatur ab. Die jeweils nach

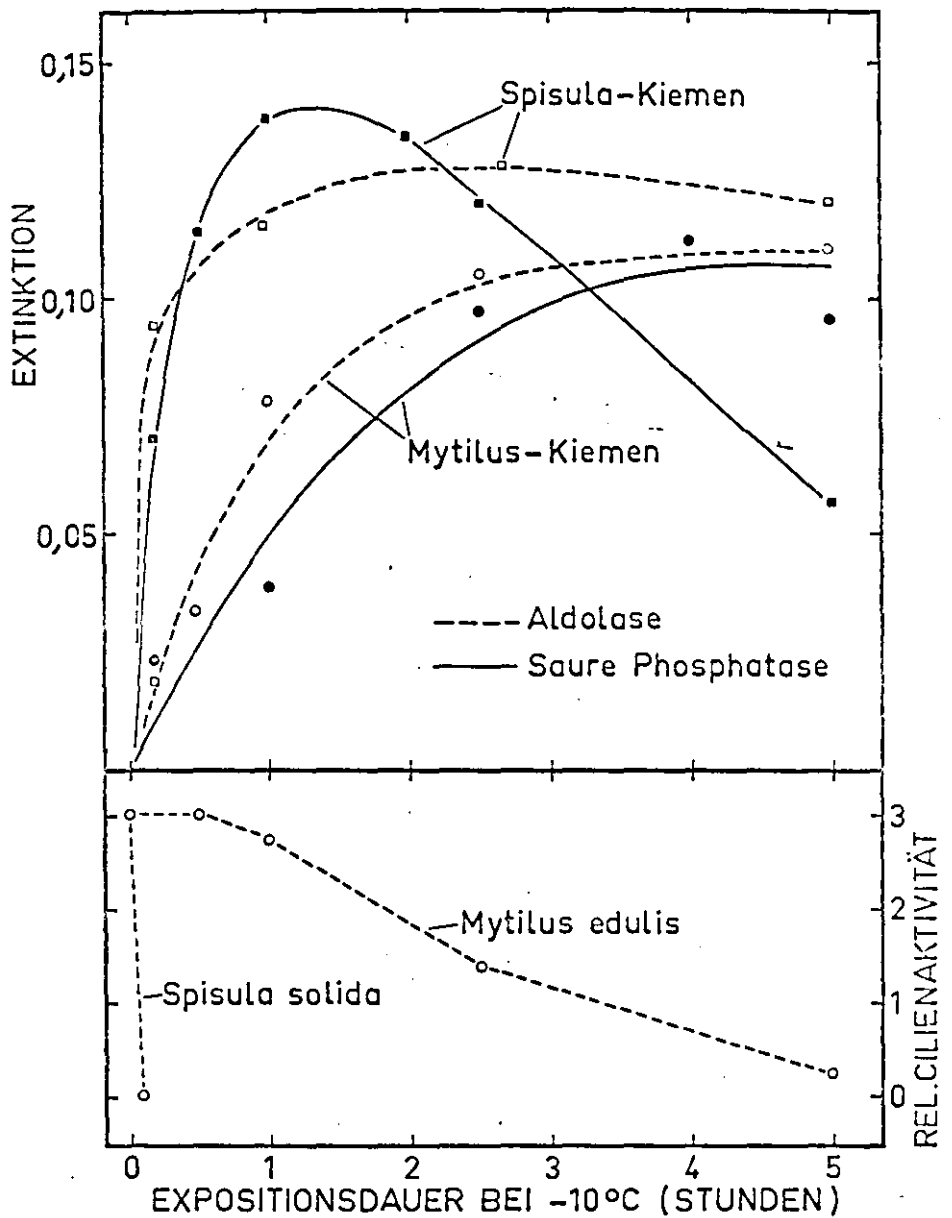


Abb. 16 : Isolierte Kiemen von *Mytilus edulis* und *Spisula solidus*. Die Wirkung der Kälteexposition (bei -10°C) auf den Austritt von Aldolase und saurer Phosphatase aus dem Gewebe. (Nach unterschiedlich langem Einfrieren von 0,5 ml Gewebe + 4,5 ml Meerwasser werden die Proben im Wasserbad bei 20°C innerhalb eines Zeitraumes von 10 min aufgetaut und anschließend 15 min zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand abpipettiert und in einem Teil davon die Enzymaktivität bei 25°C bestimmt. Mittelwerte aus 3 Versuchsansätzen, bei denen jeweils 3 Werte gemessen wurden.

Unterer Teil der Abb. : Abnahme der relativen Cilienaktivität nach unterschiedlich langer Kälteexposition des Gewebes).

Versuchszeit : Dezember 1969/Januar 1970.

dem Einfrieren und Auftauen durchgeführten Beobachtungen der Cilienaktivität sowie die Messungen der Enzymaktivitäten lassen im einzelnen folgendes über das Ausmaß der Gewebeschädigung bei zunehmender Expositionsdauer im gefrorenen Zustand erkennen (vgl. Abb. 16). Kiemengewebe von *Mytilus edulis* überlebt im Winter, wie sich auch schon in früheren Versuchen ergeben hatte, bei etwa -10°C Expositionzeiten bis über 5 h mit stark reduzierter Cilienaktivität, während das Gewebe von *Spisula* schon nach 4 min Kälteexposition keine Überlebenszeichen mehr erkennen läßt. Schon sehr kurze Kälteexposition von wenigen Minuten Dauer hat erwartungsgemäß bei den Kiemen von *Spisula* einen stark erhöhten Austritt von Aldolase und von saurer Phosphatase zur Folge. Wird das Gewebe länger eingefroren, so wird dieser Enzymaustritt noch verstärkt.

Über 2 Stunden hinausgehende Einfrierzeiten führen aber dazu, daß die Aktivität der außerhalb des Gewebes nachzuweisenden sauren Phosphatase wieder zurückgeht. Das deutet auf eine teilweise Inaktivierung dieses Enzyms hin. Bei der Gewebe-Aldolase wird eine entsprechende Aktivitätsverminderung nach längerer Kälteexposition nicht beobachtet.

Einfrieren und Auftauen hat beim Kiemengewebe von *Mytilus edulis* ein im Vergleich zu dem von *Spisula* wesentlich langsames Freiwerden der Enzyme zur Folge, jedoch treten auch hier schon nach kurzer Einfrierdauer Gewebeschäden auf, die mit einem verstärkten Entweichen beider Enzyme verbunden sind. Bei beiden Geweben ist bei zunehmender Gefrierdauer schnellere Steigerung des Entweichens der Aldolase zu beobachten, was dafür spricht, daß die schädigenden Wirkungen stärker an den Zellmembranen als an den Lysosomen angreifen. Die Tatsache, daß aber selbst bei dem relativ resistenten Gewebe von *Mytilus* schon nach kurzer Gefrierdauer Aldolase und saure Phosphatase vermehrt austreten, läßt erkennen, daß bereits Schädigungen der Zellmembranen und der Lysosomen zu einem Zeitpunkt vorliegen, an dem die mikroskopische Lebendbeobachtung des Kiemengewebes noch eine völlig "normale"

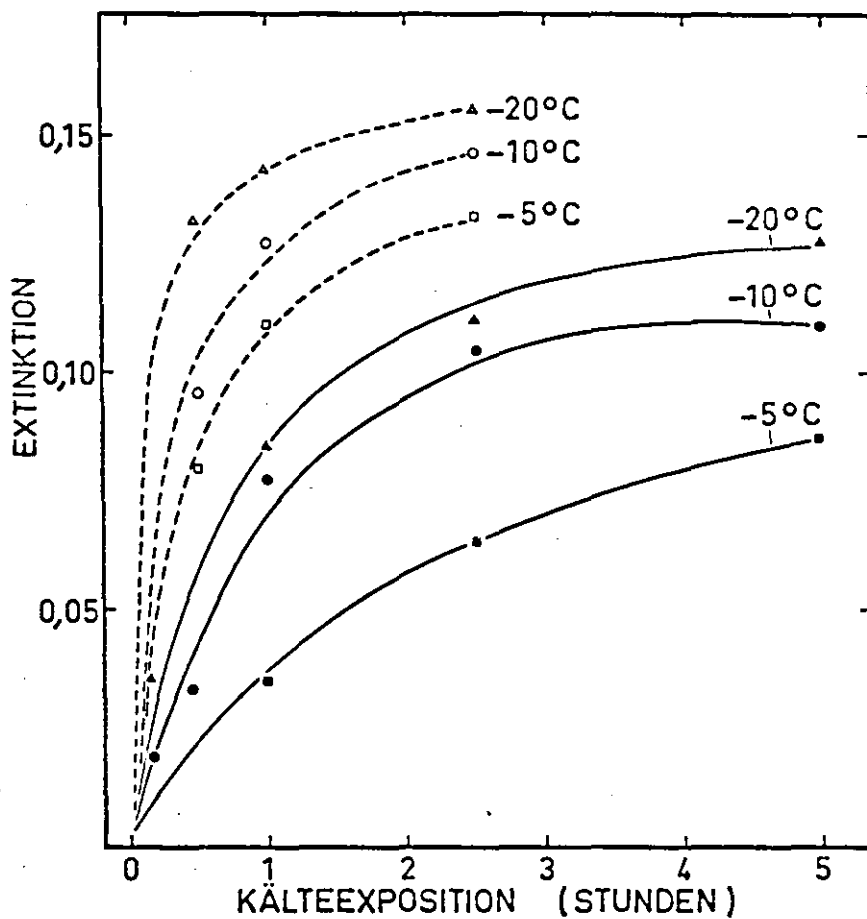


Abb. 17 : Isolierte Kiemen von *Mytilus edulis* aus der Nordsee (in 300/00 S) und Ostsee (in 150/00 S). Die Wirkung der Kälteexposition bei verschiedenen Temperaturen auf den Austritt von Aldolase. --- Ostsee-*Mytilus*, — Nordsee-*Mytilus*. Versuchszeit : Jan./Febr. 1970.

Cilienbewegung ergibt und keinerlei Anhaltspunkte für irgendwelche Schädigungen liefert.

2) Auswirkungen unterschiedlicher Kälteexposition

Untersucht wurde die Wirkung einer unterschiedlich langen Einwirkung von drei verschiedenen Kühlbadtemperaturen ($-5,2^{\circ}$, $-10,2^{\circ}$ und $-20,2^{\circ}\text{C}$, jeweils $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$) auf das Kiemengewebe von *Mytilus edulis* aus der Nordsee (in 30‰) und aus der Ostsee (in 15‰) (vgl. Abb. 17 und 18). Bei Verwendung einer Kühltemperatur von $\sim -20^{\circ}\text{C}$ tritt die Abkühlung der gefrorenen Proben wesentlich schneller ein als bei -10°C . Auch die Schädigungen des Gewebes, die sich an der Verringerung der Cilienaktivität, am eintretenden irreversiblen Cilienstillstand sowie am Entweichen der genannten Enzyme ablesen lassen, verlaufen deutlich schneller. Es fällt jedoch auf, daß nur graduelle Unterschiede zwischen den Wirkungen dieser beiden tieferen Gefriertemperaturen bestehen. Die hervorgerufenen Schäden, soweit sie durch die Beobachtungen erfaßt werden, sind demnach in beiden Fällen die gleichen.

Im einzelnen nimmt der Austritt der Aldolase und der sauren Phosphatase bei Kiemengewebe von Nordsee-*Mytilus* nach zunehmender Expositionsdauer bei beiden Gefriertemperaturen etwa in Form einer hyperbolischen Kurve zu. Dadurch, daß bei dem Gewebe von Ostsee-*Mytilus* der Phosphataseaustritt nach Gefriervorbehandlung wesentlich schneller erfolgt, verwischt sich der Unterschied für die Änderung der Austrittsgeschwindigkeit beider Enzyme. Es werden hier offensichtlich bei Einwirkung von Gefrieren und Auftauen schon innerhalb kurzer Zeit (5-10 min) sowohl Zellmembranen als auch Lysosomen stark geschädigt. Für die austretende saure Phosphatase von Ostsee-*Mytilus* tritt nach zunehmender Kälteexposition des Gewebes bei -20°C ein Aktivitätsmaximum nach einer Gefrierdauer zwischen 1-2 Stunden, nach Aufenthalt des Gewebes bei -10°C zwischen 2-3 Stunden auf. Längere Kälteeinwirkung hat Aktivitätsverminderung der sauren Phosphatase zur Folge.

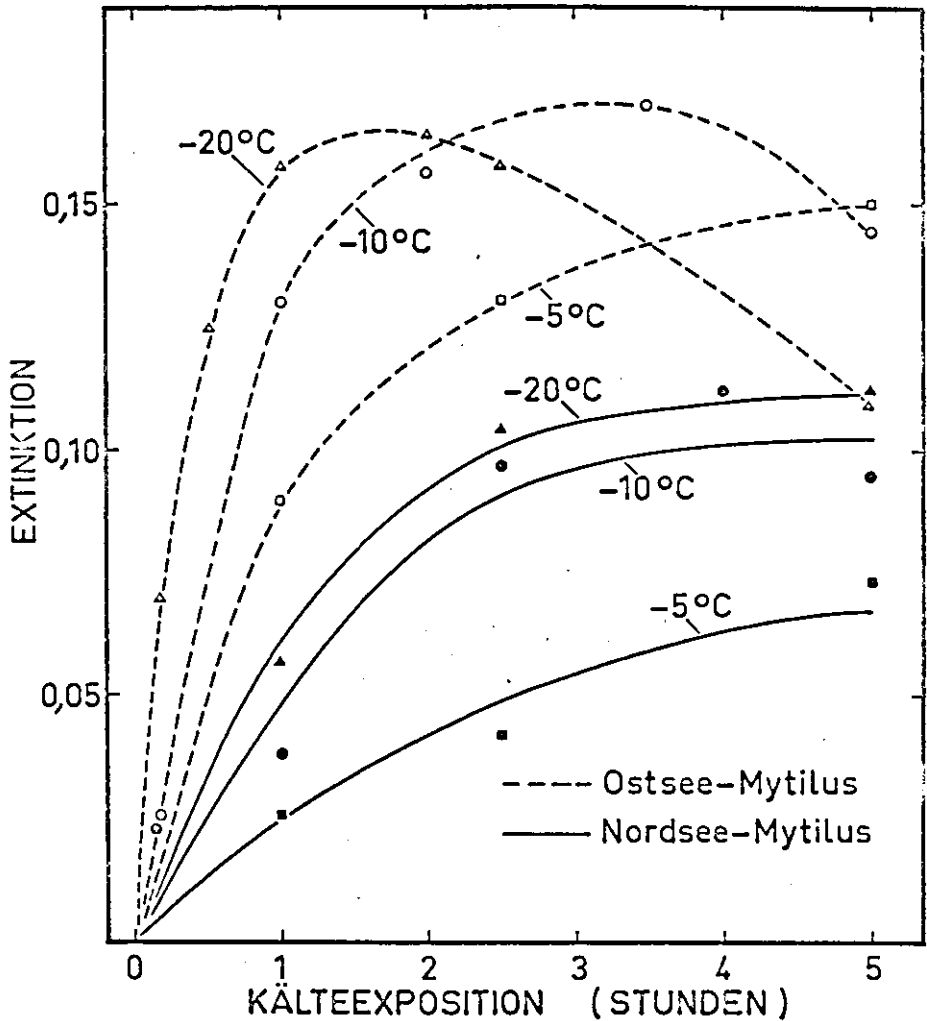


Abb. 18 : Isolierte Kiemen von *Mytilus edulis* aus der Nordsee (in 300/00 S) und aus der Ostsee (in 150/00 S). Die Wirkung der Kälteexposition bei verschiedenen Temperaturen auf den Austritt von saurer Phosphatase.
(Zur Versuchsdurchführung vgl. Abb. 16)
Versuchszeit : Jan.-März 1970.

Nach Überführen der Proben in eine Kühlbadtemperatur von $\sim -5^{\circ}\text{C}$ wurde der Beginn der extrazellulären Eisbildung nach 1-2 min durch Zufügen von Impfkristallen ausgelöst, da das Medium sonst längere Zeit unterkühlt bleiben kann, ohne daß es zum Ausfrieren kommt. Bei dieser Versuchsbedingung fällt auf, daß beim Kiemengewebe von Nordsee-Mytilus das Entweichen der Aldolase etwas verlangsamt, das der sauren Phosphatase aber relativ stärker herabgesetzt ist. Dieser Befund spricht dafür, daß die Lysosomen unter dieser Bedingung entsprechend weniger geschädigt werden.

E. DISKUSSION

Die an homologen Geweben von verschiedenen Arten gewonnenen Werte für die Gefrier-, Abkühlungs- und Hitzeresistenz liefern dem ökologischen Physiologen eine Grundlage sowohl für vergleichende Untersuchungen als auch für solche über die Resistenzmechanismen und die Abhängigkeit der Resistenzen von inneren und äußeren Faktoren. Dabei lassen die Befunde an einer größeren Zahl mariner Lamellibranchier aus verschiedenen geographischen Regionen erkennen, daß Arten, die im oberen Litoral an der europäischen Nordseeküste vorkommen, eine höhere zelluläre Gefrierresistenz aufweisen als solche von weniger exponierten und sublitoralen Standorten. Entsprechendes gilt für Lamellibranchier von der amerikanischen Atlantikküste. Vor allem die Höhe der winterlichen Gefrierresistenz bestimmt die Überlebenschancen bei extrem niedrigen Temperaturen, die an exponierten Standorten der höheren geographischen Breiten herrschen können. Ihr entspricht bei Muscheln etwa die in normalem Meerwasser durch mehrwöchige Kälteadaptation auch zu anderen Jahreszeiten erreichte Resistenzhöhe.

Während sich für boreale Lamellibranchier, die im Eulitoral überwintern, hohe zelluläre Gefrier- und Abkühlungsresistenzen als charakteristisch erweisen, lassen im subtropisch-tropischen Eulitoral nur noch wenige Arten, deren Verbreitungsgebiete sich weiter nach Norden erstrecken, ähnlich große zelluläre Resistenzen gegenüber niedrigen Temperaturen erkennen. Hierzu gehören z.B. *Crassostrea virginica* und *Brachidontes exustus*. Bemerkenswert ist, daß sich Repräsentanten der etwa 2000 km voneinander entfernt an der Küste von Florida und vom Kap Cod lebenden Populationen der Amerikanischen Auster nach Vorbehandlung bei den gleichen Anpassungsbedingungen nicht nennenswert in ihrer zellulären thermischen Resistenz unterscheiden, so daß man auf genetisch bedingte Rassenunterschiede schließen könnte. Bei anderen eulitoralen Arten der Subtropen und Tropen sind die geringen Werte für die zelluläre

Abkühlungs- und Gefrierresistenz in der Größenordnung mit denen vergleichbar, die in der borealen Region bei kälteempfindlichen Tiefenformen gefunden werden.

Muscheln aus dem flachen Wasser im Bereich der unteren Gezeitenregion oder aus sublitoralen Zonen der Subtropen haben eine wesentlich geringere Abkühlungsresistenz, oft verbunden mit einer gleichzeitig verringerten zellulären Hitzeresistenz. Letztere liegt aber meist noch in einer Größenordnung, die bei Arten der borealen Region für das Überleben in der oberen Gezeitenregion ausreicht.

Will man die experimentell ermittelten Ergebnisse über die zelluläre Gefrierresistenz mariner litoraler Muscheln mit ökologischen Beobachtungen über die in strengen Wintern durch Frosteinwirkung angerichteten Schäden vergleichen, so muß man berücksichtigen, daß die ganzen Tiere in der freien Natur oftmals zusätzlich durch besondere Verhaltensweisen und Schutzreaktionen die Wahrscheinlichkeit ihres Überlebens erhöhen können. Das ist z.B. der Fall, wenn sich Arten in großer Individuendichte in mehreren Lagen zu Bänken zusammenfinden, sich zwischen Steinen bzw. in Felsenspalten aufhalten oder im Boden eingegraben leben und dadurch den Intensitätsschwankungen der Außenfaktoren nicht so extrem unterworfen sind. Wichtig für das Überleben der exponierten Muscheln sind dabei die Wärmereserven ihres Mantelhöhlenwassers und des Untergrundes. Für viele Tiere im Litoral kann auch die wärmeisolierende Wirkung des Eises wichtig sein, ebenso die Tatsache, daß durch Sonneneinstrahlung unter einer Eisschicht sogar Temperaturerhöhungen möglich sind (vgl. WILLIAMS, 1970). Manche litorale Arten können sich der Einwirkung extremer Temperaturen entziehen, indem sie sich bei einem bestimmten Abkühlungsgrad von der Unterlage loslösen und auf diese Weise in tiefere Wasserschichten gelangen (BENTLEY JUTTING, 1943; NEWELL, 1970, S. 468-472).

Aus Untersuchungen von BLEGVAD (1929) an einem dänischen Sandstrand geht hervor, daß nach mehrmonatiger strenger Frosteinwirkung praktisch alle Exemplare der

Mollusken *Littorina littorea* und *Mytilus edulis* zerstört waren, während Arten, die im Vergleich zu *Mytilus edulis* im Experiment eine geringere zelluläre Gefrierresistenz aufweisen (*Macoma*, *Cardium*, *Mya*), z. T. überlebten. Daß hier unter den frostempfindlicheren Formen mehr Überlebende als unter relativ frostresistenten gefunden wurden, muß wohl durch den unterschiedlichen Expositionsgrad am Standort und die hierdurch bedingten unterschiedlichen Temperaturbedingungen erklärt werden. Während *Littorina* und *Mytilus* den Wirkungen des Frostes direkt ausgesetzt waren, hatten die im Boden eingegrabenen Arten (*Cardium*, *Mya*, *Macoma*) nicht die gleichen Temperaturextreme zu ertragen.

In anderen Fällen ergeben sich bessere Übereinstimmungen zwischen der experimentell ermittelten Gefrierresistenz und der Vernichtungsrate in der Natur. So beobachtete CRISP (1964b) nach dem strengen Winter 1962/63, daß im Eulitoral an der Küste Sünglands von *Mytilus edulis* 0-30 %, von *Cardium edule* 50-60 %, von *Ostrea edulis* 50-100 % der Individuen abgestorben waren. Auch die zelluläre Gefrierresistenz dieser Arten nimmt in der gleichen Reihenfolge ab (vgl. Tab. 3, S. 20).

Ebenfalls bestehen zwischen der Abkühlungsresistenz (gemessen am Eintritt der Kältestarre im Abkühlungsexperiment sowie am Überleben bei Unterkühlung) und der in strengen Wintern in sublitoralen Bereichen beobachteten Mortalitätsrate deutliche Beziehungen. Arten, die in der freien Natur erhebliche Schäden davontrugen (*Abra alba*, *Spisula solida*), lassen auch eine geringe Abkühlungsresistenz ihrer isolierten Gewebe erkennen.

Bei der Analyse der Abhängigkeit der zellulären thermischen Resistenz von einzelnen Faktoren wurden beträchtliche jahreszeitliche Schwankungen der zellulären Gefrierresistenz mit einem Maximum im Winter und einem Minimum im Sommer nachgewiesen. Diese unterscheiden sich deutlich von dem jahreszeitlich bedingten Verlauf der zellulären Hitzeresistenz, der nach DREGOLSKAYA (1963) bei *Mytilus galloprovincialis* und nach

FRIEDRICH (1967) bei *Mytilus edulis* besonders eng mit dem Reproduktionszyklus der Tiere verbunden ist.

WILLIAMS (1970, S.149) weist darauf hin, daß von ihm bei Untersuchungen in dem Zeitraum zwischen Juni 1963 und Februar 1966 keine jahreszeitlichen Variationen der Gefrierresistenz bemerkt wurden. Dieses Ergebnis muß wohl darauf zurückgeführt werden, daß er die Tiere vor den Versuchen längere Zeit im Kühlschrank bei $+3^{\circ}\text{C}$ zwischen feuchten Algen und nicht in belüftetem Meerwasser aufbewahrt hat. Wie Untersuchungen in meiner Arbeit zeigen, wird die zelluläre Gefrierresistenz mariner Muscheln sowohl durch Temperaturadaptation als auch durch vorherigen Luftaufenthalt oder Halten der Tiere bei Sauerstoffmangel erheblich beeinflusst.

Starke jahreszeitliche Schwankungen der Ganztier-Gefrierresistenz litoraler mariner Evertebraten mit geringen Werten im Sommer und hohen im Winter wurden auch von KANWISHER (1955), SÖMME (1966) sowie CRISP & RITZ (1967) ermittelt. REMNERT & WISNIEWSKI (1970) kommen auf Grund ihrer Untersuchungen an der Milbe *Molgus littoralis* und an Collembolen von Spitzbergen zu dem Schluß, daß selbst arktische litorale Tiere im Sommer nicht unbedingt eine besonders große Resistenz gegenüber Temperaturen unter dem Nullpunkt aufweisen müssen.

Im Vergleich zu ausgeprägten jahreszeitlichen Schwankungen der zellulären Gefrierresistenz bei *Mytilus edulis* aus der Nordsee weisen Repräsentanten dieser Art von Populationen aus der Ostsee nur eine sehr geringe zelluläre Gefrierresistenz (Tab. 10) mit nur unbedeutenden jahreszeitlich bedingten Änderungen (Abb. 7) auf. Entsprechend unterschiedliches Resistenzverhalten wie bei den Muscheln in der freien Natur wurde auch im Experiment nach Vorbehandlung bei verschiedenen Temperaturen und Salzgehalten erreicht. Wichtig zur Erklärung der auftretenden Gefrierresistenzänderungen nach Umsetzen der Tiere in Medien mit verändertem Salzgehalt erscheint der Befund, daß bis zur endgültigen Einstellung eines relativ konstanten Resistenzniveaus längere Zeit beansprucht wird als für die osmotische Angleichung

der Muscheln an den neuen Salzgehalt erforderlich ist (vgl. THEEDE, 1965). Auch WILLIAMS (1970) stellte fest, daß die Steigerung der zellulären Gefrierresistenz nach Überführung der Versuchstiere in Meerwasser mit erhöhtem Salzgehalt nicht parallel zur Zunahme des osmotischen Wertes des Innenmediums verläuft, sondern erst einsetzt, wenn sich dieser schon nahezu an den des Außenmediums angeglichen hat. Er verfolgte allerdings die eintretenden Resistenzänderungen nur über mehrere Tage. Nach Überführung von Muscheln aus der Ostsee in Meerwasser von 32⁰/oo S werden ebenfalls schon deutliche Zunahmen der zellulären Gefrierresistenz nach einigen Tagen Anpassungsdauer beobachtet. Diese Resistenzänderungen dauern aber zusätzlich noch längere Zeit an und sind im einzelnen stark temperaturabhängig. So steigt die zelluläre Gefrierresistenz während des Aufenthaltes der Tiere im Meerwasser bei niedriger Temperatur (5⁰C) länger an und erreicht schließlich wesentlich größere Werte als bei 15⁰C. Die relativ lange Dauer bis zum Abschluß der Resistenzänderung bei der höheren Anpassungstemperatur (15⁰C) spricht dafür, daß auch hier noch ein echter Adaptationsprozeß wirksam ist und die eintretende Gefrierresistenzänderung nicht einfach als eine direkt mit der osmotischen Angleichung des Tieres an das neue Außenmedium verbundene Reaktion aufzufassen ist. Die unterschiedliche Höhe der endgültig erreichten Resistenzwerte ist offensichtlich durch die Wirkung von kombinierter Temperatur- Salzgehalts- Adaptation bedingt (vgl. THEEDE, 1969 b). KÄHLER (1970) untersuchte bei *Enchytraeus albidus* den Einfluß der Anpassung an eine größere Zahl verschiedener Temperatur- Salzgehalts-Kombinationen auf die Gefrierresistenz der ganzen Tiere. Vergleicht man seine Ergebnisse mit denen des Autors, die an isolierten Muschelkiemen gewonnen wurden, so ergeben sich prinzipielle Übereinstimmungen. Sowohl Enchytraeen als auch isolierte Muschelkiemen sind nach vorheriger Hälterung der Tiere bei hohen Salzgehalten und niedrigen Temperaturen am resistertesten. Dagegen treten nach Vorbehandlung bei hohen

Temperaturen oder niedrigen Salzgehalten bei beiden Objekten adaptationsbedingte Änderungen der Gefrierresistenz letzten Endes ganz zurück.

Während sich bei mehreren eulitoralen Lamelli-branchierarten eine "sinnvolle" Gefrierresistenzadaptation ergab, konnten bei der tropisch-subtropischen Art *Chione cancellata* "sinnvolle" Änderungen der Hitze- und Abkühlungsresistenz nachgewiesen werden. Eine Änderung der Gefrierresistenz war jedoch bei dieser Art nicht erfaßbar. Dieser Befund läßt auf unterschiedlich wirksame Mechanismen bei der Adaptation der Gefrierresistenz und der Abkühlungsresistenz schließen. Die verschiedene Wirkung eines Ca-Ionenzusatzes zum Außenmedium auf beide Resistenzen (Tab. 12 und 13) ist ein weiteres Beispiel dafür, daß die Abkühlungs- und Gefrierresistenz durch ein und denselben Faktor nicht gleich beeinflußt zu werden brauchen. Wenn auch eine vollständige Deutung dieses Befundes aufgrund des gegenwärtigen Wissensstandes noch nicht möglich ist, so erscheint dieses Phänomen doch verständlich, wenn man von der Tatsache ausgeht, daß Schädigungen, die primär durch Gefrieren und Auftauen hervorgerufen werden, sich von denen durch Abkühlung stark unterscheiden. Schäden durch Abkühlung werden in erster Linie darauf zurückgeführt, daß für die Lebenserhaltung wichtige Funktionen (Fermentaktivitäten, Stoffwechselprozesse, Osmo- und Ionenregulation) unter einen kritischen Wert absinken und dadurch ein mehr oder weniger langsam eintretender Tod verursacht wird (Literatur s. FRECHT et al., 1955; KINNE, 1963). Bei Gefrierschäden werden dagegen in erster Linie die Lipoproteinmembranen von Zellen und Zellorganellen betroffen, welche nicht nur gegenüber Dehydrierung und hohen Elektrolytkonzentrationen, die bei extrazellulärer Eisbildung auftreten, sondern auch gegenüber den mechanischen Wirkungen der Eiskristalle, insbesondere bei intrazellulärer Eisbildung, empfindlich reagieren (FARRANT, 1970). Auch der vom Autor nach Gefriervorbehandlung isolierter Kiemengewebe gemessene verstärkte Austritt einiger Enzyme (Aldolase aus dem Cytoplasma, saure Phosphatase aus den Lysosomen) läßt bei diesen Objekten auf Membranschädigungen schließen.

Unter den Zellorganellen stellten sich die Lysosomen als besonders empfindlich heraus (KOHN, 1960; CHILSON et al., 1965). Auf Beschädigungen des endoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrien weisen u.a. KAROW & WEBB (1965) hin. Die Wirkungen des Gefrierens auf Mitochondrien wurden von RUDNICK (1967) eingehend analysiert. Zahlreiche Befunde über weitere Gefrierschäden werden bei MERYMAN (1966) referiert.

Nach JANKOWSKY, LAUDIER & FRECHT (1969) ist die Überlebensdauer von Polypen der Gattung *Laomedea* bei einer niedrigen Temperatur wesentlich geringer, wenn außer extrazellulärer auch intrazelluläre Eisbildung auftritt. Die Autoren konnten bei diesen Organismen intrazelluläre Eisbildung an einem plötzlichen Dunkelwerden erkennen. Isolierte Muschelkiemen, in einer ähnlichen Versuchskammer beobachtet, wurden bei Gefrier-temperaturen von -5° bis -30°C meist von den Schnittstellen her dunkler. Bei diesen Objekten ist aber nicht sicher auf das Vorhandensein von intrazellulärem Eis zu schließen, da hier das Dunkelwerden auch durch Eisbildung im Interlamellarraum und vor allem in den reichlich vorhandenen Lakunen bedingt sein kann.

Die Bedingungen in den Zellen, die bei marinen Lamellibranchiern bewirken, daß das Einfrieren mehr oder weniger lange ertragen wird, lassen sich aufgrund fremder und eigener Untersuchungen wie folgt charakterisieren: KANWISHER (1955) fand mit Hilfe kalorimetrischer Untersuchungen, daß bei einigen litoralen Mollusken ein relativ hoher Anteil des Wassergehaltes extrazellulär ausfrieren konnte, ohne letale Folgen zu haben. Nach WILLIAMS (1970) trat der Tod durch Gefrieren bei *Mytilus edulis* ein, wenn mehr als 64% des Wassergehaltes ausgefroren waren, was bei Abkühlung unter -10°C erfolgte. Bei der frostempfindlicheren *Venus mercenaria* fror diese Wassermenge schon bei -6°C aus. Die Miesmuschel verhält sich nach WILLIAMS während des Gefriervorganges so, daß etwa 20% ihres Wassergehaltes osmotisch nicht in Erscheinung treten. Diese os-

motisch unwirksame Wassermenge scheint für die Gefrierresistenz von *Mytilus* wichtig zu sein, weil durch sie ein höherer Hydratationsgrad auch bei niedrigeren Temperaturen länger aufrechterhalten werden kann. Das hat zur Folge, daß das "kritische Minimalvolumen" der Zellen nicht so leicht unterschritten wird (MERKMAN, 1970). Wodurch dieser Teil des Gewebewassers osmotisch unwirksam wird, ist noch nicht geklärt. Da nach WILLIAMS der Gehalt an freien Aminosäuren in den Zellen hierfür nicht verantwortlich zu sein scheint und Gefrierschutzsubstanzen wie Glycerin und DMSO bei Muscheln nicht nachgewiesen werden konnten, zieht dieser Autor in Betracht, daß das Wasser an Feinstrukturen oder großmolekulare Stoffe (z.B. Glycoproteine) gebunden sein könnte.

In diesem Zusammenhang möchte ich darauf hinweisen, daß die marinen Muschelarten, bei denen eine hohe zelluläre Gefrierresistenz beobachtet wurde, auch eine hohe zelluläre Salzgehaltsresistenz besitzen. Da beim Gefrieren von Meerwasser die elektrolythaltige Restflüssigkeit konzentriert wird, muß das Gewebe den mit extrazellulärer Eisbildung verbundenen Dehydrierungsvorgängen und Elektrolytwirkungen im Falle des Überlebens standhalten. Eine hohe zelluläre Gefrierresistenz setzt demnach eine hohe Resistenz gegenüber Dehydrierung und hohen Elektrolytkonzentrationen voraus. LEVITT (1958) gibt zahlreiche Beispiele aus der Botanik an, bei denen enge Beziehungen zwischen der Resistenz gegenüber Dehydrierung und gegenüber Gefrieren bestehen. Beispiele aus der Zoologie sind u.a. bei PROSSER & BROWN (1962), Chapter 9, aufgeführt; vgl. auch ASHWOOD-SMITH (1970). Wichtig scheinen hierbei u.a. Membranstabilitäten zu sein.

Wie THEEDE (1965) an *Mytilus*-Kiemem nachwies, ist mit der Anpassung von Tieren aus dem Brackwasser an hohe Salzgehalte nicht nur eine Steigerung der zellulären Gefrierresistenz, sondern auch eine Zunahme der zellulären Resistenz gegenüber hohen Salzkonzentrationen verbunden. Nach LANGE & MOSTAD (1967) weisen die

Zellen von *Mytilus edulis* in einem weiten Salzgehaltsbereich eine wirkungsvolle Volumregulation auf, wobei Veränderungen des intrazellulären Aminosäurespiegels in Abhängigkeit vom Salzgehalt des Außenmediums eine wichtige Rolle spielen. Die Wirksamkeit und Anpassungsfähigkeit der isosmotischen Zellangleichung und der zellulären Ionenregulation dürften aufs engste mit der individuellen Verschiebbarkeit der osmotischen Resistenzbereiche durch Härtung bei unterschiedlichen Salzgehalten verknüpft sein.

Die durch den Anpassungssalzgehalt beeinflussen intrazellulären Bedingungen wirken sich nicht nur direkt auf die Gefrierresistenz aus, sondern modifizieren auch die Wirkungen anderer Faktoren (O_2 -Mangel, Luftexposition, Gefrierschutzsubstanzen, Anpassungstemperaturen) auf die zelluläre Resistenz. Diese Befunde und die Erscheinung der relativ "unspezifischen" Resistenzbeeinflussung durch den Salzgehalt des Außenmediums, die sich z.B. daran zeigt, daß im Brackwasser verschiedene Resistenzen auf zellulärer Ebene gleichzeitig verringert sind (vgl. Kap. D.II.4), spricht dafür, daß hierbei auch die strukturelle Stabilität empfindlicher Zellkomponenten betroffen ist. An diesem Punkt müssen weitere Untersuchungen einsetzen.

Der Wirkungsmechanismus der in dieser Arbeit benutzten Gefrierschutzsubstanzen dürfte in erster Linie darauf beruhen, daß ein Teil des extra- und intrazellulären Wassers gebunden wird und sich bei einer bestimmten Abkühlung weniger Eis bildet. Beim Ansteigen der osmotischen Konzentration während des Gefrierens bleibt außerdem die Salzkonzentration in den Zellen länger unter einem schädigenden Wert, und dem Gewebe wird pro Zeiteinheit weniger Lösung entzogen (LOVELOCK, 1954; NASH, in MERYMAN, 1966; FARRANT, 1970; FARRANT & WOOLGAR, 1970; MERYMAN, 1970). Durch Vorbehandlung mit solchen Gefrierschutzsubstanzen kann die geringe zelluläre Gefrierresistenz von Muscheln aus dem Brackwasser annähernd auf eine bei Individuen aus normalem Meerwasser gefundene Resistenzhöhe gesteigert werden (vgl.

auch THEEDE, 1965)). Letztere wird aber durch entsprechende Behandlung noch beträchtlich darüber hinaus erhöht, wobei sich außerdem - ähnlich wie nach KÄHLER (1970) bei *Enchytraeus albidus* - die zellulären Resistenzunterschiede kält- und warmangepaßter Muscheln verringern. Das legt den Gedanken nahe, daß in den Zellen auch bei der Gefrierresistenzadaptation in der Kälte Bedingungen geschaffen werden, die in der Wirkungsweise Ähnlichkeit mit der der Gefrierschutzsubstanzen aufweisen. Offensichtlich können diese intrazellulären Veränderungen nur bei hohem Salzgehalt im Außenmedium zustande kommen.

Insgesamt erweist sich die zelluläre Gefrierresistenz mariner Lamellibranchier als eine sehr stark von Reaktionen auf Umweltbedingungen und individuellen Adaptationen abhängige Größe. Den litoralen Muscheln, die aufgrund ihres Genotyps in der Lage sind, bei den entsprechenden Lebensbedingungen eine mehr oder weniger hohe zelluläre Gefrierresistenz aufzubauen, stehen zahlreiche sublitorale Formen gegenüber, denen diese Fähigkeit nahezu völlig fehlt.

Für die zukünftige Forschung bleibt von allem die weitere Analyse der Resistenz- und Adaptationsmechanismen im subzellulären Bereich.

F. ZUSAMMENFASSUNG

1) Die zellulären Gefrier-, Abkühlungs- und Hitzeresistenzen mariner Lamellibranchier aus verschiedenen Regionen zeigen deutliche Beziehungen zur geographischen Verbreitung der Arten und deren Exposition im Litoral. Boreale Muschelarten, die in exponierter Lage im Eulitoral überwintern, weisen eine größere zelluläre Gefrierresistenz auf als im Boden geschützter lebende Formen oder solche, die auf sublitorale Wasserschichten beschränkt sind. Gewebe von tropischen eulitoralischen Muscheln ist ähnlich frostempfindlich wie das von Arten aus dem Sublitoral der gemäßigten Zone. Untersuchungen der zellulären Hitze- und Gefrierresistenz an geographisch weit voneinander entfernten Populationen derselben Arten (*Crassostrea virginica*, *Mytilus edulis*, *Macoma balthica*) ergaben nur so geringe Abweichungen, daß bei ihnen nicht auf erbliches unterschiedliches Resistenzverhalten (Rassenbildung) geschlossen werden kann. Unter den litoralen Arten ein und desselben Expositionsgrades erweisen sich im Experiment solche als empfindlicher gegenüber Abkühlung und Gefrieren, bei denen in der freien Natur Massensterben in kalten Wintern bei extrem niedrigen Temperaturen beobachtet wird.

2) In normalem Meerwasser treten bei Lamellibranchiern aus dem oberen Litoral der temperierten Zone große jahreszeitlich bedingte Unterschiede der zellulären Gefrierresistenz auf. Dabei fällt das Resistenzmaximum jeweils in den Winter, das Minimum in den Sommer. Die geringe zelluläre Gefrierresistenz bei Muscheln aus dem Brackwasser weist dagegen, verglichen mit Werten von Exemplaren aus normalem Meerwasser, nur sehr kleine jahreszeitliche Schwankungen auf.

3) Ein ähnlich unterschiedliches zelluläres Resistenzverhalten, wie es sich bei Muscheln aus der freien Natur ergab, wird im Experiment durch Vorbehandlung der Tiere mit verschiedenen Temperatur-Salzgehalts-Kombinationen erreicht. Dabei haben niedrige Temperaturen zusammen mit hohen Salzgehalten die relativ größte zelluläre Gefrierresistenz zur Folge.

4) Die Anpassungsdauer bis zur endgültigen Einstellung der zellulären Gefrierresistenz ist nach Erniedrigung der Temperatur und gleichzeitiger Erhöhung des Salzgehaltes länger als bei alleiniger Änderung der Anpassungstemperatur. Die Zunahme der zellulären Gefrierresistenz nach Temperaturerniedrigung benötigt einen längeren Zeitraum als ihre Abnahme nach Temperatursteigerung.

5) Die erheblichen Steigerungen der zellulären Gefrierresistenz, die durch Exposition der Muscheln an der Luft, durch Hälterung in O_2 -armem Meerwasser sowie durch sog. Gefrierschutzsubstanzen (Glycerin, DMSO) erreicht werden können, werden im einzelnen sehr durch die Temperatur- und Salzgehaltsbedingungen während der Vorbehandlung modifiziert.

6) Bei Veränderung der Anpassungstemperatur im Bereich von 10° - $23,5^{\circ}\text{C}$ zeigt die subtropisch- tropische Art *Chione cancellata* eine "sinnvolle" Adaptation der zellulären Hitze- und Abkühlungsresistenz, dagegen keine erfassbare Änderung der geringen zellulären Gefrierresistenz.

7) Auch Erhöhung des Ca-Gehaltes im Außenmedium wirkt sich auf die zelluläre Abkühlungs- und Gefrierresistenz mariner Muscheln unterschiedlich aus. Bei *Abra alba* hat sie eine erhöhte zelluläre Abkühlungsresistenz zur Folge, die zelluläre Gefrierresistenz wird dadurch bei *Mytilus edulis* aus dem Brackwasser nicht deutlich beeinflusst, bei *Mytilus* aus normalem Meerwasser dagegen erniedrigt.

8) Nach Hitzeschockvorbehandlung isolierter Kiemenstücke ist gleichzeitig mit einer Steigerung der Hitzeresistenz eine Zunahme der Resistenz gegenüber Säurezusatz zum Meerwasser verbunden. Gegenüber Gefrieren, Cyanid und Äthanol wurde keine Erhöhung der Resistenz gefunden.

9) Der nach Einfrieren und Auftauen isolierter Kiemen zunehmende Austritt von Aldolase (aus dem Cytoplasma) und von saurer Phosphatase (aus den Lysosomen) läßt auf frühzeitig eintretende Membranschädigungen schließen. Teilweise Inaktivierung von saurer Phosphatase wurde erst nach "Absterben" des Gewebes festgestellt.

Danksagungen: Mein Dank gilt besonders Herrn Professor Dr. C. SCHLIEPER für die Förderung der Untersuchungen, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Gewährung von Sachmitteln und dem "Institute of Marine Science" in Miami für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes während meines dortigen Forschungsaufenthaltes im Herbst 1967. Weiterhin danke ich den Mitarbeitern dieses Institutes, besonders Herrn Professor Dr. A. PROVENZANO, Professor Dr. Ch. LANE und Professor Dr. G. VOSS für ihre Hilfsbereitschaft. Herrn B. WORK schulde ich Dank für die Hilfe bei der Tierbeschaffung in Miami, ebenso den Kapitänen und Mannschaften der Forschungsschiffe in Kiel, dem technischen Assistenten Herrn W. STRIBERNY für die Hilfe bei einigen Experimenten, außerdem Herrn H. JÜNGLING für die Anfertigung der Einzelzeichnungen.

G. ZITIERT LITERATUR

- ABBOTT, R.T. : American seashells. 541 pp. Princeton, N.J. : Van Nostrand Co. 1954.
- ALEXANDROV, V.Y. : Cytophysiological and cytosecological investigations of resistance of plant cells toward the action of high and low temperature. Quart. Rev. Biol. 39, 35-77 (1964).
- ASHWOOD-SMITH, M.J. : Effects of low temperatures on microorganisms, plants, and cold-blooded animals. In : Current trends in Cryobiology, pp. 5-42. Ed. by A.U. SMITH. London and New York : Plenum Press 1970.
- BASEDOW, T. : Gibt es eine thermische Schockanpassung (ein "heat" und "cold-hardening") bei Tieren ? Kiel : Dissertation. Math.-Nat. Fak. 40 S. 1968.
- BEISENHERZ, G., H.J. BOLTZE, Th. BÜCHER, R. CZOK, K.H. CARBADE, E. MEINER-ARMNDT und G. PFLEIDERER : Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceralddehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang. Z. Naturforschg. 8b, 555-577 (1953).
- BENDALL, D.S., and C. DE DUVE : Tissue fractionation studies. 14. The activation of latent dehydrogenases in mitochondria from rat liver. Biochem. J. 74, 444-450 (1960).
- v.BENTHEM- JUTTING, T. : Mollusca IC. Fauna van Nederland, 1-477 (1943).
- BERGMEYER, H.-U. (Ed.) : Methoden der enzymatischen Analyse. 1065 S. Weinheim/Bergstr.: Verlag Chemie 1962.
- BLEGVAD, H. : Mortality among animals of the littoral region in ice winters. Reports Danish Biol. Station 35, 49-62 (1929).
- BOGEN, H.J. : Untersuchungen über Hitzetod und Hitzeresistenz pflanzlicher Protoplaste. Planta 36, 298-340 (1948).
- BROEKHUYSEN, G.J. : A preliminary investigation of the importance of desiccation, temperature and salinity as factors controlling the vertical distribution of certain intertidal marine gastropods in False Bay, South Africa. Trans. Roy. Soc. South Afr. 28, 255-292 (1940).
- BRONGERSMA-SANDERS, M. : Mass mortality in the sea. In : Treatise on marine ecology and paleoecology. Vol. 1. Ecology, pp. 941-1010. Ed. by Y.W. HEDGPETH. (Mem. Geol. Soc. Am. 67). Baltimore : Waverly Press 1957.
- BUNT, J.S. : Thermal energy as a factor in the biology of the polar regions. In : Thermobiology, pp. 558-590. Ed. by A.H. ROSE. London and New York : Academic Press 1967.

- CHALKLEY, H.W. : The relation of numbers of *Paramecium caudatum* to their ability to withstand high temperatures. *Physiol. Zool.* 7, 408 (1930).
- CHILSON, O.P., L.A. COSTELLO and N.O. KAPLAN : Effects of freezing on enzymes. *Fed. Proc.* 24, Suppl. 15, 55-65 (1965).
- COURTNEY, W.A.M. & J.E. WEBB : The effects of the cold winter of 1962/63 on the Helgoland population of *Branchiostoma lanceolatum* (PALLAS). *Helgoländer wiss. Meeresunters.* 10, 301-312 (1964).
- CRISP, D.J., (Ed.) : The effects of the severe winter of 1962-63 on marine life in Britain. *J. Anim. Ecol.* 33, 165-210 (1964 a).
- The effects of the winter of 1962/63 on the British marine fauna. *Helgoländer wiss. Meeresunters.* 10, 313-327 (1964 b).
 - and D.A. RITZ : Changes in temperature tolerance of *Balanus balanoides* during its life-cycle. *Helgoländer wiss. Meeresunters.* 15, 98-115 (1967).
- DENKO, E.J. : The influence of cultivation temperature on cellular resistance of *Cabomba aquatica* AUBL. In : *The cell and environmental temperature*, pp. 161-165. Ed. by A.S. TROSHIN. (Transl. from Russ.) Engl. ed. by C.L. PROSSER. Oxford : Pergamon Press 1967.
- DILL, D.B., E.F. ADOLPH and C.G. WILBER (Eds.) : Adaptation to the environment, 1056 pp. In : *Handbook of physiology. Section 4.* Washington, D.C. : American Physiological Society 1964.
- DREGOLSKAYA, J.N. : The influence of the seawater salinity on the thermostability of ciliary epithelium of *Actinia* (Russ.). *Cytologija* 3, 471-473 (1961).
- Heat resistance of ciliated epithelium of gills of *Mytilus galloprovincialis* L. from the Black Sea. (Russ.) In : *Problems of cytology of animals*, pp. 43-50. Ed. by B.P. USHAKOV. Moscow : Academy of Sciences 1963. (Summary in English).
- FARRANT, J. : Mechanisms of injury and protection in living cells and tissues at low temperatures. In : *Current trends in Cryobiology*, pp. 139-152. Ed. by A.U. SMITH. London and New York : Plenum Press 1970
- & A.E. WOOLGAR : Possible relationships between the physical properties of solutions and cell damage during freezing. In : *The frozen cell*, pp. 97-119. Ed. by G.E.W. WOLSTENHOLME & M.O'CONNOR. London : J. & A. Churchill 1970.
- FELDMAN, N.L. et al. : Heat-hardening of plant cells under natural and experimental conditions. In : *The cell and environmental temperature*, pp. 152-160. Ed. by A.S. TROSHIN. (Transl. from Russ.) Engl. ed. by C.L. PROSSER. Oxford : Pergamon Press 1967.

- FELDMAN, N.L. : The effect of heat hardening on some enzymes from plant leaves. *Planta* (Berl.) 78, 213-225 (1968).
- FRIEDRICH, L. : Experimentelle Untersuchungen zum Problem zellulärer nichtgenetischer Resistenzänderungen bei der Kiessmuschel *Mytilus edulis* L. *Kieler Meeresforsch.* 23, 105-126 (1967).
- GERLACH, S.A. : Über die Fauna der Gezeitenzone von Spitzbergen. *Proc. 5th marine biol. Symp. Botanica Gothoburgensia* 2, 81-92 (1965).
- GIESE, A.C. : Cell physiology. 3rd edition. 671 pp. London : W.B. Saunders Company 1968.
- GUNTER, G. : Temperature. In: *Treatise on marine ecology and paleoecology* Vol. 1 : Ecology, pp. 159-184. Ed. by J.W. HEDGPETH. (*Mem. Geol. Soc. Am.* 67). Baltimore : Waverly Press 1957.
- HEILBRUNN, L.V. : Reactions of various salts on the first state of the surface precipitation in *Arbacia* at eggs and protoplasm. *Protoplasma* 11, 558-573 (1930).
- An outline of general physiology. Third edition. Philadelphia : W.B. Saunders Company 1952.
- HENDERSON, J.T. : Lethal temperatures of Lamellibranchiata. *Contr. Canad. Biol. Fish.* 4, 397-411 (1929).
- HOHENDORF, K. : Der Einfluß der Temperatur auf die Salzgehaltstoleranz und Osmoregulation von *Nereis diversicolor* O.F. MUELL. *Kieler Meeresforsch.* 19, 196-218 (1963).
- IVLEVA, J.V. : The relation of tissue heat resistance of polychaetes to osmotic and temperature conditions of the environment. In : *The cell and environmental temperature*, pp. 232-237. Ed. by A.S. TROSHIN (Transl. from Russ.) Engl. ed. by C.L. PROSSER. Oxford : Pergamon Press 1967.
- JANKOWSKY, H.D., H. LAUDIEM & H. PRECHT : Ist eine intrazelluläre Eisbildung bei Tieren tödlich ? Versuche mit Polypen der Gattung *Laomedea*. *Mar. Biol.* 3, 73-77 (1969).
- JOLY, M. : A physico-chemical approach to the denaturation of proteins. 350 pp. London : Academic Press 1965.
- KÄHLER, H.H. : Über den Einfluß der Adaptationstemperatur und des Salzgehaltes auf die Hitze- und Gefrierresistenz von *Enchytraeus albidus* (Oligochaeta). *Mar. Biol.* 5, 315-324 (1970).
- KANWISHER, J.W. : Freezing in intertidal animals. *Biol. Bull. Woods Hole*, 109, 56-63 (1955).
- Histology and metabolism of frozen intertidal animals. *Biol. Bull.* 116, 258-264 (1959).
- Freezing in intertidal animals. In : *Cryobiology*, pp. 487-494. Ed. by H.T. MERYMAN. London : Academic Press 1966.

- KAROW, A.M. jr. & W.R. WEBB : Tissue freezing. A theory for injury and survival. *Cryobiology* 2, 99-108 (1965).
- KINNE, O. : Experimentelle Untersuchungen über den Einfluss des Salzgehaltes auf die Hitzeresistenz von Brackwassertieren. *Zool. Anz.* 152, 10-16 (1954).
- The effects of temperature and salinity on marine and brackish water animals. I. Temperature. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 1, 301-340 (1963).
 - The effects of temperature and salinity on marine and brackish water animals. II. Salinity and temperature-salinity combinations. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 2, 281-389 (1964 a).
 - Non-genetic adaptation to temperature and salinity. *Helgoländer wiss. Meeresunters.* 9, 433-458 (1964 b).
- KOHN, A. : Lysis of frozen and thawed cells of *Escherichia coli* by lysozyme and their conversion into spheroblasts. *J. Bact.* 79, 697-706 (1960).
- KÜHLMORGEN-HILLE, G. : The effect of the severe winter 1962/63 on the bottom fauna of the Kiel Bay. *Annales Biologiques* 20, S. 98 (1963).
- LACHERSPETZ, K.Y.H. and I. DUBITSCHER : Temperature acclimation of the ciliary activity in the gills of Anodonta. *Comp. Biochem. Physiol.* 17, 665-671 (1966).
- LANGE, R. and A. MOSTAD : Cell volume regulation in osmotically adjusting marine animals. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 1, 209-219 (1967).
- LEVITT, J. : Frost, drought and heat resistance. *Protoplasmatologia* 8, 1-27 (1958).
- LOMAGIN, A.G., T.A. ANTROPOVA and A. IDMETE : The influence of heat-hardening on the resistance of plant cells to different injurious agents. In : *The cell and environmental temperature*, pp. 180-181. Ed. by A.S. TROSHIN. (Transl. from Russ.) Engl. ed. by C.L. PROSSER. Oxford : Pergamon Press 1967.
- LOVELOCK, J.E. : Biophysical aspects of the freezing and thawing of living cells. *Proc. roy. Soc. Med.* 47, 60-62 (1954).
- MARTUTANI, K. : Studies on the temperature and salinity resistance of *Tigriopus japonicus*. IV. Heat resistance in relation to salinity of *Tigriopus japonicus* acclimated to dilute and concentrated sea water. *Seiro-Seitai (Physiol. Ecol.)* 10, 59-67 (1962).
- McLEESE, D.W. : Effects of temperature, salinity and oxygen on the survival of the american Lobster. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 13, 247-272 (1956).

MERYMAN, H.T. (Ed.) : Cryobiology. 775 pp. London : Academic Press 1966.

- The exceeding of a minimum tolerable cell volume in hypertonic suspension as a cause of freezing injury. In : The frozen cell, pp. 51-67. Ed. by G.E.W. WOLSTENHOLME and M. O'CONNOR. London : J. & A. Churchill 1970.

NAIR, N.B. and H. LEIVESTAD : Effect of low temperature on the vertical distribution of two wood-boring crustaceans. Nature 182, 814-815 (1958).

NAROSKA, V. : Vergleichende Untersuchungen über den Einfluß des hydrostatischen Druckes auf Überlebensfähigkeit und Stoffwechselintensität mariner Evertibraten und Teleostee. Kieler Meeresforsch. 24, 95-123 (1968).

NEUMANN, D. : Die Analyse limitierender Ionenwirkungen bei Meeres- und Süßwassertieren mit Hilfe ökologischer, physiologischer und züchterischer Methoden. Kieler Meeresforsch. 18, 38-54 (1962).

NEWELL, R.C. : Biology of intertidal animals. 555 pp. London : Logos Press Ltd. 1970.

NORDSIECK, F. : Die europäischen Meeresmuscheln. 256 S. Stuttgart : Gustav Fischer Verlag 1969.

PETERSEN, G.H. : The distribution of *Balanus balanoides* (L.) and *Littorina saxatilis* (OLIVI) var. *groenlandica* MENKE in northern west Greenland. Meddr. Grønland 159 (No 9), 1-47 (1962 a).

- *Balanus balanoides* (L.) (Cirripedia) Life cycle and growth in Greenland. Meddr. Grønland 159 (No 12), 1-114 (1962 b).

PONAT, A. : Untersuchungen zur zellulären Druckresistenz verschiedener Evertibraten der Nord- und Ostsee. Kieler Meeresforsch. 23, 21-47 (1967).

PRECHT, H. : Über die Resistenzadaptation wechselwarmer Tiere an extreme Temperaturen und ihre Ursachen. Helgoländer wiss. Meeresunters. 9, 392-411 (1964).

- J. CHRISTOPHERSEN und H. HENSEL : Temperatur und Leben. 514 pp. Heidelberg : Springer-Verlag 1955.
- und J. CHRISTOPHERSEN : Temperaturadaptation des Cilienepithels isolierter Kiemen und Fühler-spitzen von Mollusken. Z. wiss. Zool. 171, 197-209 (1965).
- T. BASEDOW, R. BERNCK, F. LANGE, W. THIEDE und L. WILKE : Reaktionen und Adaptationen wechselwarmer Tiere nach einer Änderung der Anpassungstemperatur und der zeitliche Verlauf. Helgoländer wiss. Meeresunters. 13, 369-401 (1966).

- PRECHT, H. und E. LINDNER : Reaktionen, Regulationen und Adaptationen der Tiere nach Veränderung von Temperatur und Salzgehalt. Versuche mit *Zoothamnium hiketes* (Ciliata, Peritricha). Helgoländer wiss. Meeresunters. 13, 354-368 (1966).
- PROSSER, C.L. (Ed.) : Molecular mechanisms of temperature adaptation. 390 pp. Washington, D.C. : American Association for the Advancement of Science 1967.
- and F.A. BROWN : Comparative animal physiology. 688 pp. London : W.B. SAUNDERS Comp. 1962.
- READ, K.R.H. : The haemoglobin of the bivalved mollusc *Phacoides pectinatus* (GMELIN). Comp. Biochem. Physiol. 15, 137-158 (1962).
- REMMERT, H. und W. WISNIEWSKI : Low resistance to cold in polar animals in summer. Oecologia (Berl.) 4, 111-112 (1970).
- RESHÖFT, K. : Untersuchungen zur zellulären osmotischen und thermischen Resistenz verschiedener Lamellibranchier der deutschen Küstengewässer. Kieler Meeresf. 17, 65-84 (1961).
- ROSE, A.H. (Ed.) : Thermobiology. 653 pp. London : Academic Press 1967.
- RUDNICK, M.H. : Vergleichende Untersuchungen über die Einwirkung höherer und tieferer Temperaturen auf die Katalaseaktivität. Zool. Jb. Physiol. 73, 227-250 (1967).
- SCHEIBMAIR, G. : Hitzeresistenz-Studien an Mooszellen. Protoplasma 29, 102-110 (1938).
- SCHLACHTER, N.A. and J.S. CHERNOKOZHEVA : Changes in heat-resistance of isolated tissues as a result of prelin heating. In : The cell and environmental temperature, pp. 417-418. Ed. by A.S. TROSHIN (Transl. from Russ.) Engl. ed. by C.L. PROSSER. Oxford : Pergamon Press 1967.
- SCHLIEPER, C. : Genotypische und phaenotypische Temperatur- und Salzgehalts-Adaptationen bei marinen Bodenevertebraten der Nord- u. Ostsee. Kieler Meeresforsch. 16, 180-185 (1960).
- Physiologie des Brackwassers. In REMANE, A. & C. SCHLIEPER : Die Biologie des Brackwassers. Stuttgart : Schweizerbart 1958. (Binnengewässer 22, 217-330).
- Praktikum der Zoophysiologie. 318 S. Stuttgart : G. Fischer 1965.
- Genetic and nongenetic cellular resistance adaptation in marine invertebrates. Helgoländer wiss. Meeresunters. 14, 482-509 (1966).

- SCHLIEPER, C. : High pressure effects on marine invertebrates and fishes. *Mar. Biol.* 2, 5-12 (1968 a).
- (Ed.) : Methoden der meeresbiologischen Forschung. 322 S. Jena : VEB G. Fischer 1968 b.
 - J. BLASING und E. HALLSBAND : Experimentelle Veränderungen der Temperaturtoleranz bei stenothermen und eurythermen Wassertieren. *Zool. Anz.* 149, 163-169 (1952).
 - und R. KOWALSKI : Über den Einfluß des Mediums auf die thermische u. osmotische Resistenz des Kiemengewebes der Miesmuschel *Mytilus edulis* L. *Kieler Meeresforsch.* 12, 37-45 (1956 a).
 - und R. KOWALSKI : Quantitative Beobachtungen über physiologische Ionenwirkung im Brackwasser. *Kieler Meeresforschungen* 12, 154-165 (1956 b).
 - H. FLÜGEL and J. RUDOLF : Temperature and salinity relationships in marine bottom invertebrates. *Experientia* 16, 470-477 (1960).
 - - and H. THEEDE : Experimental investigations of the cellular resistance of marine temperate and tropical bivalves: Results of the Indian Ocean Expedition of the German Research Association. *Phys. Zool.* 40, 345-360 (1967).
- SCHOLANDER, P.F., W. FLAGG, R.J. HOCK and L. IRVING : Studies on the physiology of frozen plants and animals in the arctic. *J. cell. comp. Physiol.* 42, (Suppl. 1), 1-56 (1953).
- SERAVIN, L.N., J.J. SKOBLO and D.V. OSSIPOV : The influence of thermal adaptation on enzymic thermostability of *Paramecium caudatum*. (Russ.) In : Heat resistance of cells and animals, pp. 161-170. Ed. by B.P. USHAKOV. Moscow : Academy of Sciences 1965. (Summary in English).
- SÖMME, L. : Seasonal changes in the freezing-tolerance of some intertidal animals. *Nytt Mag. for Zool.* 13, 52-55 (1966).
- The effect of acclimation and glycerol injection on mortality and pupation in larvae of *Ephestia kühniella* after exposures at low temperatures. *Entomologia exp. appl.* 11, 143-148 (1968).
- SOUTHWARD, A.J. : Note on the temperature tolerances of some intertidal animals in relation to environmental temperatures and geographical distribution. *J. mar. biol. Assoc.* 37, 305-346 (1958).
- SMITH, A.U. : The resistance of animals to cooling and freezing. *Biol. Rev.* 33, 197-253 (1958).
- STRESEMANN, E. (Ed.) : Exkursionsfauna von Deutschland Wirbellose 1, 488 S. Berlin : VEB Verlag Volk und Wissen 1957.

- THAMDRUP, H.M. : Beiträge zur Ökologie der Wattenfauna auf experimenteller Grundlage. Meddr. Kommn. Danm. Fisk.-og Havunders. Serie Fiskeri 10 (2), 1-125 (1935).
- THEEDE, H. : Experimentelle Untersuchungen über die Filtrationsleistung der Miesmuschel *Mytilus edulis* L. Kieler Meeresforsch. 19, 20-41 (1963).
- Vergleichende experimentelle Untersuchungen über die zelluläre Gefrierresistenz mariner Muscheln. Kieler Meeresf. 21, 153-166 (1965).
 - Probleme der Frostresistenz bei Meerestieren. Naturwissensch. Rundschau 20, 468-475 (1967).
 - Einige neue Aspekte bei der Osmoregulation von *Carcinus maenas*. Mar. Biol. 2, 114-120 (1969 a).
 - Experimentelle Untersuchungen über physiologische Unterschiede bei Evertebraten und Fischen aus Meer- und Brackwasser. Limnologica (Berlin) 7, 119-128 (1969 b).
 - & J. LASSIG : Comparative studies on cellular resistance of bivalves from marine and brackish waters. Helgoländer wiss. Meeresunters. 16, 119-129 (1967).
 - und A. PONAT : Die Wirkung der Sauerstoffspannung auf die Druckresistenz einiger mariner Wirbellosen. Mar. Biol. 6, 66-73 (1970).
 - - K. HIROKI and C. SCHLIEPER : Studies on the resistance of marine bottom invertebrates to oxygen-deficiency and hydrogen sulphide. Mar. Biol. 2, 325-337 (1969).
- TIEDTKE, B. : Über die ökologische Bedeutung eines extrem kalten Winters für die eulitorale Hartbodenfauna der Kieler Förde. Schr. Naturw. Ver. Schlesw.-Holst. 35, 33-60 (1964).
- TILBROCK, P.J. : The terrestrial environment and invertebrate fauna of the maritime Antarctic. In : Antarctic ecology. Vol. 2, pp. 886-896. Ed. by M.W. HOLGATE. London and New York : Academic Press 1970.
- TODD, M.-E. & P.A. DEHNEL : Effect of temperature and salinity on heat-tolerance in two grapsoid crabs, *Hemigrapsus nudus* and *Hemigrapsus oregonensis*. Biol. Bull. mar. biol. Lab., Woods Hole 118, 150-172 (1960).
- TROSHIN, A.S. (Ed.) : The cell and environmental temperature. (Transl. from Russ.), Engl. ed. by C.L. PROSSER. 549 pp. Oxford : Pergamon Press 1967.
- USHAKOV, B.P. : Thermostability of cells and proteins of poikilotherms and its significance in speciation. Physiol. Rev. 44, 518-560 (1964).

- USHAKOV, B.P. : The problem of associated changes in protein thermostability during the process of speciation. Helgoländer wiss. Meeresunters. 14, 466-481 (1966).
- Cellular resistance adaptation to temperature and thermostability of somatic cells with special reference to marine animals. Mar. Biol. 1, 153-160 (1968).
- VERNBERG, F.J. : Latitudinal effects on physiological properties of animal populations. Ann. Rev. Physiol. 24, 517-546 (1962).
- C. SCHLIEFER and D.E. SCHNEIDER : The influence of temperature and salinity on ciliary activity of excised gill tissue of molluscs from North Carolina. Comp. Biochem. Physiol. 8, 271-285 (1963).
 - & W.B. VERNBERG : Studies on the physiological variation between tropical and temperate zone fiddler crabs of the genus *Uca*. 9. Thermal lethal limits of southern hemisphere *Uca* crabs. *Oikos* 18, 118-123 (1967).
 - - Lethal limits and the zoogeography of the faunal assemblages of coastal Carolina waters. Mar. Biol. 6, 26-32 (1970).
- VOGEL, W. : Über die Hitze- und Kälteresistenz von *Zoothamnium hiketes* PRECHT (Ciliata, Peritrit.). Z. Wiss. Zool. 173, 344-378 (1966).
- WARMKE, G.L. & R.T. ABBOTT : Caribbean seashells, 348 pp. Naberth, Penn. : Livingstone Publishing Co. 1962.
- WELLS, H.W. and J.E. GRAY : The seasonal occurrence of *Mytilus edulis* on the Carolina Coast as a result of transport around Cape Hatteras. Biol. Bull. 119, 550-559 (1960).
- WILBUR, K.M. and C.M. YONGE : Physiology of Mollusca. Vol. 1, 473 pp. London : Academic Press 1964.
- WILLIAMS, R.J. : Cryoprotective agents in intertidal mollusks. Abstract. Cryobiology 3, 370, 1967.
- The mechanism of cryoprotection in the intertidal mollusk *Mytilus*. Abstract. Cryobiology 4, p. 250 (1968).
 - Freezing tolerance in *Mytilus edulis*. Comp. Biochem. Physiol. 35, 145-161 (1970).
- WOLSTENHOLME, G.E.W. and M. O'CONNOR (Eds.) : The frozen cell. 316 pp. London : J. & A. Churchill 1970.
- ZHIRMUNSKY, A.V. : A comparative study of cellular thermostability of marine invertebrates in relation to their geographical distribution and ecology. In : The cell and environmental temperature, pp. 209-218. Ed. by A.S. TROSHIN. (Transl. from Russ.), Engl. ed. by C.L. PROSSER. Oxford : Pergamon Press 1967.

- ZHYUBIKAS, J.J. : The resistance to cold in *Mytilus edulis* L., living on littoral and tidepools of east Murman. Vestn. Leningrad Univ. 15, 27-31 (1968). (Russ., engl. summary).
- ZIEGELMEIER, E. : Einwirkungen des kalten Winters 1962/63 auf das Makrobenthos im Ostteil der Deutschen Bucht. Helgoländer wiss. Meeresunters. 10, 276-282 (1964).